

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal)



TESIS DOCTORAL

***INFLUENCIA DE DIFERENTES ESTRATEGIAS
REPRODUCTIVAS Y NUTRICIONALES SOBRE LA
FISIOLOGIA OVARICA EN CONEJAS PRIMÍPARAS***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Arias Álvarez

Bajo la dirección de los doctores:

Pedro Luis Lorenzo González, Rosa M^a García García y Pilar García Rebollar

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-2400-4

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal)



***INFLUENCIA DE DIFERENTES ESTRATEGIAS
REPRODUCTIVAS Y NUTRICIONALES SOBRE LA
FISIOLOGIA OVARICA EN CONEJAS PRIMÍPARAS***

TESIS DOCTORAL

María Arias Álvarez

Madrid, 2009

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal)



***INFLUENCIA DE DIFERENTES ESTRATEGIAS
REPRODUCTIVAS Y NUTRICIONALES SOBRE LA
FISIOLOGIA OVARICA EN CONEJAS PRIMÍPARAS***

TESIS DOCTORAL

María Arias Álvarez

Madrid, 2009



El Dr. Pedro Luis Lorenzo González, Profesor Titular de Universidad y la Dra. Rosa M^a García García, Profesora Ayudante Doctor de Universidad, del Departamento de Fisiología (Fisiología Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y; la Dra. Pilar García Rebollar, Profesora Titular de Universidad, del Departamento de Producción Animal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid, hacen constar:

Que la Memoria presentada por la Licenciada en Veterinaria D^a María Arias Álvarez, con el título: ***“Influencia de diferentes estrategias reproductivas y nutricionales sobre la fisiología ovárica en conejas primíparas”***, ha sido realizada bajo nuestra dirección y que tras su revisión consideramos que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

Madrid, Junio de 2009

Fdo: D. Pedro Luis Lorenzo González

Fdo: D^a. Rosa M^a García García

Fdo: D^a. Pilar García Rebollar

Esta Memoria ha sido realizado gracias a la concesión y disfrute de una Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador, financiada por la Comunidad de Madrid y el Fondo Social Europeo.

La motivación es lo que te ayuda a empezar. El hábito te mantiene firme en tu camino

*A mi familia, por su apoyo incondicional...
gracias, por todo*

Aquello que guardas en tu corazón determinará el transcurrir de tu vida

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, por la gran dedicación y constancia mostrada hacia mi persona y hacia este proyecto común:

A Pedro, por darme la oportunidad de entusiasmarme con mi trabajo y de encontrar mi camino profesional. Gracias por tu ayuda, tus consejos y por ser tan paciente conmigo. Tenías razón en tantas cosas....

A Rosa... que te puedo decir que ya no sepas... gracias por todo!! he aprendido muchísimo de ti en estos años, de tu tesón, de tu ética profesional y personal. Para mí, eres mas que una directora de tesis-compañera, eres una guía, una amiga.

A Pilar, por tu punto de vista “productivo”, por tirar del carro de toda la marabunta de gente que pasa por la granja y por tu disposición siempre para hacer más y más experimentos.

Al Dr. Manel López-Bejar, por el que siento un gran admiración, tanto laboral como personal. Por iniciarme en el mundo de la fluorescencia y los gránulos corticales... A Irina por ser mi compañera y amiga durante mi estancia en la UAB y después. Por esas noches en Budapest...!! A la Dra. Maite Paramio por abrirme las puertas de su laboratorio de fecundación in vitro. En general, a toda la gente de la UAB que conocí y que me hicieron sentir como en mi casa durante esos meses...parte de mi corazón ya es catalán...

Al Dr. Patrick Lonergan, por ser aún mejor persona que -investigador. Por darme la oportunidad de hacer una estancia en su laboratorio, por estar siempre pendiente y por su hospitalidad. A María y a Pablo por hacerme mas fácil la vida allí y por su compañerismo. A toda la gente del laboratorio de Lyons y por supuesto, a Nora y Gerry, mis padres adoptivos irlandeses.

A Manolo Avilés, por su gran hospitalidad y por abrirme las puertas al mundo de la microscopía electrónica y de su casa. A Irene por dedicarme su tiempo en enseñarme las técnicas. A María José y a toda la gente del laboratorio por el calor recibido y por acogirme como una más en tan poco tiempo.

A mis compañeros “del otro lado” del INIA, gracias por “adoptarme” y ser tan buena gente. En particular, a Pablo gracias por tu gran ayuda, por escucharme y por animarme a seguir adelante cuando lo más lo necesitaba.

Al Dr. Julio Contreras, por sus ánimos, y su optimismo. Al Dr. Luis Revuelta, por solucionar esas miles de pequeñas cosas que los demás no sabemos hacer...

A todo el personal del Departamento de Fisiología de la UCM, en especial a Rosana, Alicia y Gonzalo por su cercanía.

Al servicio confocal de la UAM y a Lola, por su compañía en la oscuridad.... Al Dr. González-Bulnes y a Laura por su colaboración con las determinaciones hormonales.

A los mataderos de Jumogar y Bozano por su gran disposición. A los técnicos de la Granja Experimental y en general a todos los que de una u otra manera han estado implicados y han hecho posible que los “días marmota” finalmente dieran su fruto.

A todos los que en algún momento han contribuido en este proyecto, gracias, gracias, gracias!!

Además...

A mis amigos, por intentar entender “a eso a lo que me dedico” y hacerme sentir su cercanía en los momentos más difíciles y también en los más felices, que han sido muchos! Gracias por hacerme desconectar de vez en cuando para salvar mi integridad mental....!!

A mi madre y mi padre, gracias por vuestros consejos, por estar ahí apoyándome siempre con todas mis decisiones, por vuestra infinita paciencia conmigo a lo largo de este periodo tan duro...y durante toda mi vida... porque si soy lo que soy, es gracias a vosotros.

A mi hermano, gracias simplemente por ser mi hermano, te quiero muchísimo pequeño, nunca, nunca lo olvides.

... Finalmente, a todas aquellas personas que han estado cerca en todo este tiempo, y a las que he encontrado al final del camino, por aguantar los muchos altibajos por los que he tenido que pasar sobre todo en la recta final. Gracias cielo.

A quien haya podido olvidar...

Y por su puesto, a todas “mis” conejas (la coneja, ese ser....ay!).

Todos los protocolos experimentales en los que se emplearon animales de laboratorio, fueron aprobados por el Comité de Ética del Departamento de Producción Animal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

SUMMARY

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Fisiología reproductiva de la coneja	9
2.1.1. Estatus metabólico y condición corporal durante el periodo post-parto en conejas lactantes	11
2.1.2. Factores séricos metabólicos y endocrinos relacionados con la condición corporal y la lactación	12
2.1.2.a <i>Proteínas séricas totales</i>	12
2.1.2.b <i>Ácidos grasos no esterificados</i>	13
2.1.2.c <i>Leptina</i>	14
2.1.2.d <i>Prolactina</i>	15
2.2. Fisiología ovárica de la coneja	16
2.2.1. Oogénesis y desarrollo folicular	16
2.2.2. Atresia folicular	20
2.2.3. Proceso de maduración del oocito	22
2.2.3.a <i>Maduración nuclear</i>	23
2.2.3.b <i>Maduración citoplasmática</i>	25
2.2.3.c <i>Vías de señalización en el proceso de maduración: vía de las MAPK y las STAT3</i>	29
2.2.3.d <i>Esteroidogénesis de los complejos cúmulo-oocito</i>	32
2.2.4. Ovulación y formación de cuerpo lúteo	34
2.3. Desarrollo embrionario preimplantacional	34
2.4. Estrategias de manejo reproductivo	37
2.4.1. Efecto del método de sincronización de estro sobre la fisiología reproductiva de las conejas lactantes	37
2.4.1.a <i>Tratamientos hormonales</i>	37
2.4.1.b <i>Tratamientos no hormonales: bioestimulación</i>	38
2.4.2. Efecto del intervalo parto-inseminación sobre la fisiología reproductiva de las conejas lactantes	39

2.5. Estrategias de manejo nutricional	41
2.5.1. Efecto de la nutrición sobre la fisiología reproductiva de las conejas lactantes	41
2.5.1.a. Manejo nutricional durante la recría	41
2.6. Influencia de la reserva energética sobre la función reproductiva: Leptina	43
3. MATERIAL Y MÉTODOS	47
3.1. Diseños experimentales	49
3.1.1. Estudio de estrategias de manejo reproductivo	49
3.1.1.a. Métodos de sincronización de estro	49
3.1.1.b. Ritmos reproductivos	49
3.1.2. Estudio de estrategias de manejo nutricional	50
3.1.3. Estudio de la influencia de la leptina sobre la maduración de oocitos	51
3.2. Animales y alojamiento	51
3.3. Técnicas o métodos experimentales	53
3.3.1. Análisis químico de los piensos y determinación de la energía digestible	53
3.3.2. Inseminación artificial	53
3.3.3. Bioimpedancia eléctrica	55
3.3.4. Análisis de parámetros séricos metabólicos y hormonales	55
3.3.4.a. Ácidos grasos no esterificados (NEFA)	56
3.3.4.b. Proteínas totales	56
3.3.4.c. Leptina	56
3.3.4.d. Prolactina (PRL)	57
3.3.4.e. Estradiol y Progesterona	57
3.3.5. Estudio macroscópico del ovario y de la población folicular ovárica	58
3.3.5.a. Obtención de los ovarios y descripción macroscópica	58
3.3.5.b. Estudios histológicos, de atresia folicular e inmunohistoquímicos	58
1) Categorización folicular	59
2) Detección In Situ de la apoptosis folicular	59
3) Inmunolocalización del receptor de la prolactina (PRL-R)	60
4) Inmunolocalización del receptor de la leptina (Ob-R)	61
3.3.6. Maduración <i>in vitro</i> de los oocitos de coneja	62
3.3.6.a. Recuperación de los Complejos Cúmulo-Oocito (COC) y protocolo de maduración <i>in vitro</i>	62

3.3.6.b. Valoración del grado de maduración nuclear y citoplasmática del oocito	64
3.3.6.c. Producción esteroideogénica de los complejos cúmulo-oocito después de la maduración	65
3.3.7. Viabilidad embrionaria	66
3.3.7.a. Tasa de ovulación y recogida de los embriones	66
3.3.7.b. Valoración morfológica de los embriones	66
3.3.7.c. Cultivo de embriones <i>in vitro</i>	67
3.3.8. Análisis estadístico	67
3.3.8.a. Capítulos 1 y 2	67
3.3.8.b. Capítulo 3	69
4. RESULTADOS	71
CAPÍTULO 1. INFLUENCIA DE DIFERENTES ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS SOBRE LA FISIOLÓGÍA OVÁRICA DE LAS CONEJAS PRIMÍPARAS EN EL MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	73
4.1. EXPERIMENTO 1a: Estudio de la influencia del método de sincronización de estró (eCG), o bien, con tratamientos no hormonales, mediante la separación transitoria de la camada, sobre la fisiología ovárica en conejas primíparas lactantes inseminadas en un periodo próximo al parto (día 11 post-parto)	75
4.1.1. Resumen	77
4.1.2. Diseño experimental	78
4.1.3. <i>Influence of hormonal and non-hormonal estrus synchronization methods on follicular and oocyte quality in primiparous lactating does at early postpartum period</i>	83
4.2. EXPERIMENTO 1b: Estudio del momento de la inseminación en relación al parto: día 11 post-parto (lactación temprana) o día 32 post-parto (después del destete) sobre la composición corporal y el estatus metabólico y ovárico en conejas primíparas	113
4.2.1. Resumen	115
4.2.2. Diseño experimental	116
4.2.3. <i>Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different postpartum periods in primiparous rabbit does</i>	119

CAPÍTULO 2. INFLUENCIA DE UN TIPO DE ESTRATEGIA NUTRICIONAL DURANTE LA RECRÍA SOBRE LA FISIOLOGÍA OVÁRICA DE LAS CONEJAS NULÍPARAS Y PRIMÍPARAS EN EL MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

131

- 4.3. EXPERIMENTO 2a: Estudio del efecto del sistema de alimentación durante la recría mediante la administración de un pienso fibroso, con alto contenido en lignina, sobre la composición corporal, el estatus ovárico y el desarrollo embrionario temprano preimplantacional en conejas nulíparas en el momento de su primera inseminación. 133
- 4.3.1. Resumen 135
- 4.3.2. Diseño experimental 136
- 4.3.3. *Effects of a lignin-rich fibre diet on productive, reproductive and endocrine parameters in nulliparous rabbit does* 139
- 4.4. EXPERIMENTO 2b: Estudio del efecto a medio plazo del sistema de alimentación durante la recría mediante la administración de un pienso fibroso, con alto contenido en lignina, sobre la composición corporal, el estatus ovárico y el desarrollo embrionario temprano preimplantacional en conejas nulíparas en el momento de su primera inseminación. 149
- 4.4.1. Resumen 151
- 4.4.2. Diseño experimental 152
- 4.4.3. *Follicular, oocyte and embryo features related to metabolic status in primiparous lactating does fed with high- fibre rearing diets* 156

CAPÍTULO 3: INFLUENCIA DE LA RESERVA ENERGÉTICA MEDIADA POR LA LEPTINA SOBRE EL PROCESO DE MADURACIÓN *IN VITRO* DEL OOCITO DE LA CONEJA

197

- 4.5. EXPERIMENTO 3: Inmunolocalización del receptor de la leptina en el ovario y estudio de la influencia de esta hormona sobre la maduración nuclear y citoplasmática, la secreción esteroidogénica de los complejos cúmulo-oocito, así como del mecanismo de acción intracelular a través de las vías de señalización de las MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) y de las JAK/STAT3 (Janus activated kinase/ Signal Transducer Activator Transcription). 199
- 4.5.1. Resumen 201
- 4.5.2. Diseño experimental 202

4.5.3. <i>Influence of leptin on in vitro maturation through MAPK and STAT pathways and on steroidogenic secretion in rabbit oocyte model</i>	205
5. DISCUSIÓN GENERAL	227
6. CONCLUSIONES	241
7. CONCLUSIONS	245
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	249
ANEXO I. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	
ANEXO II. ABREVIATURAS	
ANEXO III. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES	

RESUMEN

La producción intensiva de la coneja necesita elevados requerimientos energéticos ya que este animal simultanea lactación y gestación. En las conejas primíparas este hecho es todavía más acusado al presentar un balance energético negativo durante su primera lactación, ocasionando importantes pérdidas en la explotación. Estos problemas pueden resolverse utilizando prácticas que se adapten a las necesidades energéticas del animal y a su estado fisiológico en este periodo.

Para ello, la presente Tesis Doctoral tiene como objetivo general la profundización en el conocimiento de la fisiología reproductiva en las conejas primíparas, para explicar los fundamentos que permitan la aplicación de diferentes estrategias de manejo reproductivo y nutricional con el fin de minimizar los problemas que afectan a estos animales en los sistemas de producción actuales. Los estudios realizados a lo largo de los **tres capítulos experimentales** de que consta esta Memoria están enfocados principalmente en cómo estas estrategias afectan al estatus ovárico y, en particular, a la calidad de los folículos y a la competencia de los oocitos. En lagomorfos, estos mecanismos no se conocen adecuadamente, y muchas de las afirmaciones fisiológicas sobre las que se apoyan los actuales sistemas de producción se basan en estudios realizados en otras especies. Por otra parte, otros autores han utilizado puntualmente algunas de estas estrategias en conejas primíparas, pero han tenido como objetivo sólo el estudio de parámetros productivos; todo ello indica la necesidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos fisiológicos, endocrinos, metabólicos y ováricos que expliquen lo que acontece en las condiciones reproductivas señaladas.

El primer capítulo experimental consta, a su vez, de dos estudios en los cuáles se valora la influencia de diferentes estrategias reproductivas como son: la utilización de sistemas de sincronización de estro (Experimento 1a) o la modificación del ritmo de cubrición (Experimento 1b) sobre la fisiología ovárica de las conejas primíparas en el momento de la inseminación artificial (IA). A lo largo del segundo capítulo experimental se estudia el efecto a corto (Experimento 2a) y a medio plazo (Experimento 2b) de una estrategia de alimentación realizada durante la recría sobre las modificaciones en los parámetros ováricos responsables del desarrollo folicular, la maduración de los oocitos, la ovulación y el desarrollo embrionario preimplantacional. Finalmente, el tercer capítulo representa el primer estudio descrito hasta el momento sobre la influencia de una hormona relacionada con las reservas energéticas de los individuos, la leptina; en concreto, sobre cómo afecta a la maduración *in vitro* y a la respuesta esteroideogénica de los complejos cúmulo-oocito. Además, se estudia la participación de dos de las posibles vías intracelulares, a través de

las cuáles actúa esta hormona en el oocito de coneja, utilizado aquí como modelo experimental (Experimento 3).

Las conejas que se inseminan en una explotación comercial son lactantes en su mayoría, siendo este estado fisiológico el que compromete su fertilidad, especialmente en las hembras primíparas. Para solventar el efecto antagonista de la lactación, es necesario aplicar métodos de sincronización de estro efectivos y estudiar qué cambios acontecen en la fisiología ovárica que expliquen las variaciones en los parámetros reproductivos. El estudio descrito en el **Experimento 1a** se realizó con un total de 46 conejas primíparas, que fueron sincronizadas mediante un tratamiento hormonal estándar con eCG ó con un método alternativo no hormonal, mediante la separación transitoria de la camada durante 24 horas previas a la IA. El día de la IA (día 11 post-parto) se observó que las conejas de ambos grupos experimentales no presentaban diferencias en los niveles de estradiol y progesterona séricos, tampoco en el número de folículos antrales, ni en el índice de folículos con un grado avanzado de atresia. Para valorar la competencia de los oocitos procedentes de ambos grupos experimentales, éstos fueron madurados *in vitro* y se determinó el grado de maduración meiótica (mediante el porcentaje de oocitos que presentaron la configuración de metafase II) y de maduración citoplasmática (mediante la valoración de migración de los gránulos corticales) alcanzada, así como la capacidad esteroidogénica de los complejos cúmulo-oocito. Mientras que la tasa de maduración nuclear de los oocitos y la capacidad esteroidogénica *in vitro* fueron similares entre ambos grupos experimentales, el grupo de animales sincronizados con eCG, presentó un aumento significativo del número de folículos antrales con un grado medio de atresia y una disminución en la tasa de maduración citoplasmática de los oocitos madurados *in vitro*. Por lo tanto, según estos resultados, el método de sincronización de estro mediante la separación transitoria de la camada en conejas primíparas en el día 11 post-parto, presenta una mejor respuesta ovárica, relacionada con la calidad folicular y la competencia de los oocitos, que cuando se usa un tratamiento hormonal con eCG.

Otro de los factores a tener en cuenta para mejorar los parámetros reproductivos de las conejas primíparas es la elección de un ritmo reproductivo apropiado que se adapte a la fisiología de las madres y mejore el balance energético. Por ello se diseñó el **Experimento 1b**, en el cuál se valoró la posible relación entre el estatus metabólico y ovárico en las conejas primíparas en diferentes intervalos del periodo post-parto. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron un total de 90 conejas primíparas, a las cuales se les dividió al azar en dos grupos: a) hembras inseminadas el día 11 post-parto, siguiendo un ritmo semi-intensivo de producción y; b) hembras que fueron destetadas el día 28 post-parto e inseminadas el día 32 post-parto siguiendo un ritmo de producción alternativo o más extensificado. Como era de esperar, la reserva proteica, grasa y energética corporal de las madres mejoró a lo

largo del post-parto así como los niveles séricos de proteínas totales y de leptina; sin embargo, las concentraciones de ácidos grasos no esterificados (NEFA) disminuyeron, reflejando una menor movilización de los depósitos grasos. Estas modificaciones en el estatus metabólico y en la composición corporal no alteraron los niveles de estradiol, progesterona y prolactina séricas, ni tampoco la intensidad del receptor de la prolactina inmunolocalizado en el ovario de ambos grupos experimentales en el momento de la IA. Sin embargo, el estrés metabólico sí pareció afectar al estatus ovárico de las conejas inseminadas el día 11 post-parto ya que presentaron un número mas elevado de folículos atrésicos y una reducción marcada en la tasa de maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos *in vitro*; como consecuencia, la fertilidad y la prolificidad se redujeron considerablemente en esos animales. Basándonos en estos hallazgos fisiológicos, se puede considerar que la IA después del destete se postula como una alternativa real de manejo reproductivo, al menos, en las conejas primíparas.

Por otro lado, se han descrito además una serie de sistemas de alimentación que tratan de mejorar los rendimientos de las conejas primíparas, de acuerdo con los condicionantes reproductivos. Entre ellos, la utilización de piensos con porcentajes altos de fibra durante la recría ha sido una de las estrategias a tener en cuenta para solventar el problema del déficit energético. Estos piensos podrían aumentar la capacidad de ingestión y el tamaño del tracto digestivo de las conejas, aumentando posteriormente la ingestión durante la primera lactación, cuando se les suministra un pienso con un mayor contenido energético. Para constatar dicho efecto se realizaron los **Experimentos 2a y 2b**, en los que se estudió cómo afectaban estas estrategias sobre la composición corporal, el estatus ovárico y el desarrollo embrionario temprano preimplantacional en el momento de su inseminación, tanto a corto plazo (en nulíparas) como a medio plazo (en primíparas). Para ello se utilizaron un total de 95 conejas nulíparas que fueron alimentadas desde las 11 semanas de edad hasta su primer parto con piensos fibrosos con un contenido estándar de lignina ácido detergente (LAD) (Grupo SL) o con un contenido elevado en LAD (Grupo HL). Los resultados mostraron que las conejas que fueron alimentadas con el pienso HL presentaron una mayor capacidad de ingestión durante toda la recría, y primera gestación, no siendo así durante la lactación temprana. Las conejas nulíparas alimentadas con el pienso HL mostraron una reducción significativa de grasa corporal y de contenido energético, así como, unos niveles séricos de leptina menores en el momento de la primera IA. El porcentaje de desarrollo de los embriones viables que fueron cultivados *in vitro* y la fertilidad en el primer parto fueron inferiores en el grupo HL. Durante la lactación temprana hasta el momento de la segunda IA (día 11 post-parto), en ambos grupos nutricionales, los niveles séricos de proteínas totales y de leptina aumentaron, mientras que las concentraciones de NEFA disminuyeron reflejando una reducción de la movilización de grasa corporal en concordancia con el aumento significativo de proteína, grasa y de contenido energético corporal.

Los resultados mostraron que, a nivel ovárico, las dietas experimentales tampoco afectaron a los niveles séricos de progesterona, a la población de folículos antrales, a la tasa de maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos *in vitro* y a la tasa de ovulación, ni en las conejas nulíparas, ni en las primíparas. A largo plazo, las conejas primíparas alimentadas durante la recría con el pienso HL, mostraron un mayor porcentaje de oocitos con alteraciones en los patrones de migración de gránulos corticales, un mayor índice de atresia folicular, un menor número de embriones viables y una mayor tasa de embriones degenerados en el momento de la obtención. Cuando los embriones viables de ambos grupos experimentales se cultivaron *in vitro* en un medio semejante no mostraron diferencias significativas en su capacidad de desarrollo. Finalmente, la fertilidad al segundo parto fue similar para ambos tratamientos nutricionales. Los resultados de este estudio nos permiten concluir que las estrategias nutricionales basadas en la administración de piensos fibrosos, con alto contenido en lignina durante la recría, disminuyen las reservas energéticas y los niveles de leptina en la primera IA. Además, no se observan alteraciones en los parámetros ováricos medidos en este momento, pero sí durante el desarrollo embrionario *in vitro* y se reduce la fertilidad al primer parto. Durante la lactación temprana, no mejoran ni la capacidad de ingestión, ni el estatus metabólico y corporal, afectándose de forma evidente la competencia del oocito y del embrión en las conejas primíparas inseminadas en el día 11 post-parto, sin redundar en mejoras significativas en la fertilidad de las mismas.

Finalmente, debido a que los niveles séricos de leptina son indicativos de la reserva energética y de grasa corporal de los individuos y que, a su vez, esta hormona actúa modulando la calidad del oocito, se quiso valorar mediante estudios *in vitro*, si los posibles efectos del balance energético negativo observados sobre la competencia de los oocitos en los estudios anteriores, también estaban mediados por dicha hormona. Por ello, se diseñó el **Experimento 3**, que pertenece al último capítulo de la presente Memoria. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ovarios de conejas adultas procedentes del matadero. Las dos primeras partes de este experimento fueron diseñadas para constatar la inmunolocalización del receptor de la leptina (Ob-R) en el ovario de la coneja y determinar el efecto de esta hormona sobre la maduración de los oocitos de coneja *in vitro* respectivamente. Los resultados mostraron que el Ob-R se encontraba presente en el oocito y en las células del cúmulo, fundamentalmente, y que, *in vitro*, la leptina mejoraba la maduración nuclear pero no la maduración citoplasmática, relacionada con la migración de los gránulos corticales. En nuestras condiciones experimentales, diferentes concentraciones de leptina en el cultivo no modificaron significativamente la respuesta esteroideogénica de los complejos cúmulo-oocito *in vitro*, aunque en todos los grupos se produjo un incremento en la secreción de estradiol y progesterona durante el periodo de maduración. Con el fin de profundizar sobre los mecanismos de las posibles vías de señalización implicadas en las respuestas que ejerce la leptina, que están mediadas a través de su receptor, se llevó a cabo un estudio en el que se

maduraron los complejos cúmulo-oocito con o sin leptina añadiendo, a su vez, inhibidores de dos de las principales vías de señalización de esta hormona cuando se une a su receptor: inhibidores de la vía de las MAPK y de la vía de las STAT3. En los medios suplementados con leptina y en presencia de los inhibidores, los oocitos mostraron índices de maduración nuclear inferiores que cuando se emplearon medios en los que no se incluyeron ninguno de los inhibidores. Los valores obtenidos en cuanto al grado de maduración citoplasmática y secreción esteroidogénica, no se vieron afectados significativamente en los medios con o sin leptina con ambos inhibidores. Sin embargo, en los grupos madurados con leptina e inhibidores de las MAPK, se produjo un incremento en la secreción de estradiol y progesterona en el medio, aunque, el mecanismo a través del cual tuvo lugar este efecto requiere más estudios. Por lo tanto, los resultados de este experimento permiten concluir que el efecto beneficioso de la leptina sobre la maduración nuclear esta mediado por la activación de las vías de las MAPK y de las STAT3. Sin embargo, esta hormona por sí sola no parece ejercer ninguna influencia sobre la migración de los gránulos corticales de los oocitos de coneja madurados *in vitro* ni sobre la capacidad esteroidogénica de los complejos cúmulo-oocito.

SUMARY

High-yield does in industrial rabbit breeding need to improve their energy balance due to their concomitant lactation and gestation status. Primiparous rabbits show a clear negative energy balance during their first lactation, which causes a significant reduction of economic benefits in rabbit farms. However, managements adapted to the energetic and physiological requirements of these animals could be crucial to solve such problems in this complex period.

The main goal of the present PhD work was to study the use of different reproductive and feeding strategies with a focus on the reproductive physiology of primiparous rabbit does in order to minimize the adverse effect of lactation and the negative energy balance in the *postpartum* (*pp*) period. In the present memory, experimental works are presented in three chapters, throughout which the study of the ovarian response --in terms of oocyte and follicular features-- and the possible relationship of those parameters with different managements were developed. In rabbit species, these physiological mechanisms are not fully understood and many strategies in rabbit farms are based in studies made on other species. Several works have studied these managements applied to primiparous rabbit females, but always with a focus on productive outcome. This is the reason why we tried to establish the best physiology-based management for rabbit does in order to elucidate their reproductive physiology as well as some endocrine metabolic and ovarian mechanisms.

The **First chapter** includes two studies carried out to assess the influence of different reproductive strategies such as: the influence of oestrus synchronization methods (Experiment 1) or different reproductive rhythms (Experiment 2) on the ovarian physiology of primiparous rabbit does at the day of artificial insemination (AI). In the **second chapter**, the short (Experiment 3a) and medium-term (Experiment 3b) effect of a feeding strategy during the rearing period on ovarian follicular development, ovulation rate, oocyte *in vitro* maturation, and preimplantation embryo development was studied. Finally, the **third chapter** is the first study in rabbits evaluating the influence of leptin, a hormone linked to the energy reserves of animals, on *in vitro* oocyte maturation and steroidogenic response of cumulus-oocyte complexes. Besides, two possible intracellular leptin-signalling pathways have been tested in the rabbit oocyte model (Experiment 4).

Rabbit does can be inseminated early after parturition. In this time point, animals are lactating and their fertility rate is usually reduced, mainly in primiparous females. Oestrous synchronization methods are used to diminish the negative effect of lactation on reproduction in such period. A better understanding of variations in reproductive parameters would require studying the changes occurred in the ovarian physiology. A total of 46 rabbit primiparous

does was used in the **Experiment 1**, described in Chapter 1. These animals were synchronized with a standard treatment by means of equine chorionic gonadotropin (eCG) or an alternative non-hormonal treatment, namely, a transient doe-litter separation 24h before AI. No significant differences were found in serum oestradiol, progesterone concentrations, antral follicular population and rate of late atretic follicles between experimental groups at the time of AI (Day 11 *postpartum*). Besides, nuclear *in vitro* oocyte maturation (IVM) measured as metaphase II and *in vitro* steroidogenic response of cumulus-oocyte complexes (COC) did not show significant differences. However, eCG-treated does showed a significantly higher number of mid-atretic follicles compared to biostimulated rabbits and a lower *in vitro* cytoplasmic maturation rate of oocytes. In conclusion, transient doe-litter separation of primiparous lactating rabbit does inseminated in the early *postpartum* period seems to improve ovarian response in terms of follicular health and oocyte competence compared to the eCG treatment.

Choosing a reproductive rhythm adapted to physiological energy requirements of lactating does to improve the energy balance is essential to enhance reproductive success. For this reason, **Experiment 2** was designed to study a possible relationship between metabolic and ovarian status in primiparous rabbit does at different *postpartum* points. A total of 90 primiparous rabbits were submitted to: a) a semi-intensive reproductive rhythm (AI on day 11 *pp*); or b) an extensive rhythm (weaning at 28 days *pp* following by AI on day 32 *pp*). As it was expected, body protein, energy content, lipid reserves and serum protein and leptin concentrations increased during the *postpartum* period. However, serum NEFA diminished, revealing a low mobilization of body fat reserves. This influence on metabolic status and body reserves did not affect serum prolactin, oestradiol-17 β and progesterone concentrations or distribution and intensity of prolactin receptor immunostained in the ovary at AI point. Nevertheless, ovarian status was modified, since significantly higher follicular apoptosis index, lower rate of oocytes reaching metaphase II and cortical granule migration were observed. Consequently, fertility and prolificacy rate were significantly reduced. Therefore, here are reported some physiological bases in rabbits to support that AI after weaning is the best management for primiparous does.

On the other hand, considering reproductive status of primiparous rabbit females, feeding strategies have been proposed to increase their productive performances. Some nutritional management strategies have been driven to increase dietary fibre level during the rearing period. Particularly, the inclusion of indigestible lignin could increase feed intake capacity and tract digestive development in their subsequent first lactation, when a commercial energetic diet is supplied. Studies of short-term effect (**Experiment 3a**) or medium-term effect (**Experiment 3b**) of a high-lignin fibre diet during the rearing period on follicular, oocyte and embryo features and their relationship to serum endocrine and metabolic

parameters, body composition and conception rate in primiparous does at AI point were performed. In the first work (**Experiment 3a**), a total of 95 nulliparous rabbit does were fed *ad libitum* fibre-rich diets from week 11 to their first partum at week 20. Two experimental groups with high Acid Detergent Lignin (LAD) corresponding to HL or standard lignin content group (SL group) were determined. Animals fed on HL diet had a significant higher feed intake during all the rearing period and during their first pregnancy, but not in the early lactation. Animals fed HL diet had lower content of lipids, crude energy and mean serum leptin concentrations at the first AI time. *In vitro* embryo development and fertility rate were lower in the HL group as well. During early lactation, from parturition to second AI time point (Day 11 *pp*), serum protein and leptin concentrations were increased in both nutritional groups, but NEFA concentration diminished. This reflected the poor body reserves mobilization during the early *pp* period associated to the significant increase of body protein, lipids and energy content. The experimental diet did not affect ovarian status, progesterone concentrations in serum or antral follicular population. Nuclear and cytoplasmic IVM rates were also similar between both groups as well as ovulation rate in nulliparous females. No differences in embryo recovery rate were found between groups, whereas *in vitro* embryo development was increased in the SL group. Conception rate and prolificacy were improved in the SL group as well. In conclusion, nutritional strategies based in highly fibrous diets, with high lignin content supplied during the rearing period, diminish energy reserves and leptin serum concentrations at first AI time. We observed no ovarian parameter alterations, but embryo development was affected and reproductive performance reduced.

When the medium-term effect of the HL diet during the rearing period in primiparous rabbits was assessed (**Experiment 3b**), rates of nuclear oocyte maturation were lower, and cytoplasmically degenerated oocytes were significantly higher in the HL group than in the SL group, as well as follicular atresia rate on day 11*pp*. Also, a lower number of viable embryos and a higher rate of retarded *in vivo* recovered embryos were obtained compared to the SL group. When *in vivo* recovered embryos were *in vitro* cultured in a similar medium, both groups showed identical development capacity. Finally, fertility rate in the second AI was similar in both SL and HL groups. During early lactation, energy intake or metabolic status of primiparous does did not improve, and oocyte competence and embryo development were altered. In conclusion, using highly-lignified products in rearing diets does not seem to report physiological reproductive benefits in primiparous lactating does.

Serum leptin concentrations show energy reserves and body fat of animals; this hormone modulates oocyte quality. Thus, *in vitro* studies were carried out to assess the role of leptin as an endocrine link between oocyte competence and energy balance in rabbit models. As a consequence, **Experiment 4**, included in the last chapter, was performed. In it, ovaries of slaughtered adult animals were utilized. First, we confirmed immunolocalization of the leptin

receptor (Ob-R) in oocytes, cumulus and granulosa cells of the rabbit ovary. Also, we determined the effect of leptin supplementation (1-100ng/mL) on *in vitro* oocyte maturation. Leptin significantly improved nuclear oocyte maturation rates (Metaphase II) compared to those *in vitro*-matured without leptin, but it did not improve the percentage of cytoplasmically-matured oocytes in terms of cortical granule migration rate. In our experimental conditions, higher estradiol and progesterone concentration were found in spent media recovered 16h post-maturation in all groups, but leptin supplements at any concentration added to *in vitro*-maturation medium (IVM) did not significantly improve the steroidogenic response of COC. Mechanisms of possible leptin-signalling pathways mediated through their receptor were studied. Then, COC were IVM in medium supplemented or not with leptin plus a specific inhibitor of the main signalling pathways induced by this hormone when it links to the receptor: mitogen-activated protein kinases (MAPK) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) pathways. Leptin-stimulated oocyte nuclear maturation was significantly impaired when leptin-induced MAPK and STAT phosphorylation were suppressed by the specific MAPK (PD98059) and STAT (AG490) inhibitors at all concentrations studied. It does not improve cytoplasmic oocyte maturation rate or steroidogenic response of COC when inhibitors are added to the IVM medium with or without leptin. The results confirmed that the enhancement of meiotic oocyte maturation by leptin is mediated by activation of MAPK and STAT pathways in rabbit oocytes, but it does not improve cytoplasmic oocyte maturation or steroidogenic response of cumulus-oocyte complexes in rabbit models.

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La coneja presenta características reproductivas particulares, una de las cuales es que no muestra anestro post-parto pudiendo quedar gestante en intervalos de tiempo próximos al parto. En la producción intensiva de esta especie esta característica es aprovechada a nivel productivo para que los intervalos entre partos sean lo más cortos posible, haciendo que se solapen la gestación y la lactación durante periodos prolongados de tiempo; en contrapartida, ello exige unos requerimientos energéticos muy elevados. Este hecho resulta todavía más problemático en las conejas primíparas lactantes en su segunda inseminación, ya que, además, estos animales se encuentran en crecimiento y no son capaces de consumir suficiente cantidad de alimento para cubrir sus necesidades energéticas. Ello da lugar a un balance energético negativo y a un deterioro en su condición corporal, lo que genera un descenso pronunciado de la fertilidad (en torno al 40%), incrementándose los intervalos entre partos y el número de inseminaciones necesarias para obtener una gestación (Xiccato, 1996; Pascual et al., 1998; Bolet y Fortun-Lamothe, 2002; Rebollar et al., 2006a); todo ello ocasiona importantes pérdidas económicas en la explotación. Además, se estima que las condiciones en las que se realizan las primeras dos o tres inseminaciones son cruciales para que la vida productiva de la coneja sea más o menos duradera.

Estos problemas se han intentado solventar utilizando manejos más adaptados a las necesidades energéticas de la hembra y a su estado fisiológico, específicamente durante la primera lactación. Sin embargo, todavía existen importantes cuestiones por dilucidar en el conocimiento de lo que ocurre en lagomorfos, y muchas de las afirmaciones respecto a su fisiología reproductiva se refieren a estudios realizados en otras especies. Por todo ello, conocer qué ocurre en los primeros partos de la coneja, que es uno de los periodos más críticos en el rendimiento productivo de esta especie, es extremadamente interesante para establecer pautas de manejo apropiadas.

Las soluciones para mejorar el balance energético y la eficacia reproductiva en conejas primíparas lactantes pasan por la aplicación de diversas estrategias que inciden sobre los ejes reproductivo y nutricional, como son: la utilización de tratamientos de sincronización de estro efectivos previos a la inseminación artificial, la aplicación de ritmos de producción que se adapten mejor a la fisiología reproductiva de las conejas primíparas lactantes o el aumento de su capacidad de ingestión durante su crecimiento en recría. El conocimiento de los mecanismos metabólicos y endocrinos que intervienen y modulan la respuesta ovárica, sirve para establecer las bases fisiológicas que generen manejos más efectivos compatibles con una mejor gestión de las reservas energéticas de las conejas primíparas lactantes y, así, obtener mejores resultados reproductivos en la segunda inseminación.

Así pues, la presente Tesis Doctoral tiene como objetivo principal el **estudio del efecto de diferentes estrategias reproductivas y nutricionales sobre la fisiología ovárica en**

relación a las variaciones en el estatus endocrino, metabólico y la composición corporal en conejas primíparas lactantes de alta producción durante el periodo post-parto.

Para llevar a cabo dicho objetivo general se han planteado una serie de objetivos concretos que se corresponden con los tres capítulos experimentales de que consta la presente memoria:

CAPITULO 1. ESTRATEGIAS REPRODUCTIVAS

- ❖ **Experimento 1a.** Estudio de la influencia del método de sincronización de estro, mediante tratamientos hormonales con gonadotropina coriónica equina (eCG), o bien, con tratamientos no hormonales, mediante la separación transitoria de la camada, sobre la fisiología ovárica en conejas primíparas lactantes inseminadas en un periodo próximo al parto (día 11 post-parto).
- ❖ **Experimento 1b.** Estudio del momento de la inseminación en relación al parto: día 11 post-parto, (lactación temprana), o día 32 post-parto (después del destete), sobre la composición corporal y el estatus metabólico y ovárico en conejas primíparas.

CAPITULO 2. ESTRATEGIAS NUTRICIONALES

- ❖ **Experimento 2a.** Estudio del efecto del sistema de alimentación durante la recría mediante la administración de un pienso fibroso, con alto contenido en lignina, sobre la composición corporal, el estatus ovárico y el desarrollo embrionario temprano preimplantacional en conejas nulíparas en el momento de su primera inseminación.
- ❖ **Experimento 2b.** Estudio del efecto a medio plazo del sistema de alimentación durante la recría mediante la administración de un pienso fibroso, con alto contenido en lignina, sobre la composición corporal, el estatus ovárico y el desarrollo embrionario temprano preimplantacional en conejas primíparas lactantes inseminadas en un periodo próximo al parto (día 11 post-parto).

CAPITULO 3. INFLUENCIA DE LA RESERVA ENERGÉTICA MEDIADA POR LA LEPTINA SOBRE EL PROCESO DE MADURACIÓN DEL OOCITO

- ❖ **Experimento 3.** Inmunolocalización del receptor de la leptina en el ovario y estudio de la influencia de esta hormona sobre la maduración nuclear y citoplasmática, la secreción esteroidogénica de los complejos cúmulo-oocito, así como del mecanismo de acción intracelular a través de las vías de las MAPK (*Mitogen–Activated Protein Kinases*) y de las JAK/ STAT3 (*Janus activated kinase/ Signal Transducer Activator for Transcription 3*).

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA CONEJA

La coneja presenta características reproductivas diferentes a otras especies derivadas de la ausencia de un ciclo estral definido y regular ya que, la ovulación es inducida por el coito más que por el “feedback” positivo de los estrógenos. Éste genera un reflejo neuroendocrino que estimula la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH, *Gonadotropic Releasing Hormone*) por el hipotálamo (Pau y Spies, 1986; Kaynard *et al.*, 1990), con la consiguiente descarga preovulatoria de la hormona luteinizante (LH, *Luteinizing Hormone*) lo que desencadena el proceso de maduración del oocito y la ovulación (Mills y Gerardot, 1984; Pau *et al.*, 2000).

La introducción de la ciclicidad de la producción y la inseminación artificial (IA) en “bandas” o en días fijos de la semana han mejorado de manera significativa el manejo y la productividad en las granjas cunícolas. Debido a las características particulares de esta especie, es necesario aplicar métodos de inducción de la ovulación, mediante la administración de análogos sintéticos de GnRH por vía intramuscular en el momento de la IA (Theau-Clément *et al.*, 1990; Rebollar *et al.*, 1992).

Así, en las granjas cunícolas, se pueden seguir diversos ritmos reproductivos en función del momento en el que las conejas sean inseminadas después del parto (Imagen 2.1):

- ❖ **Ritmo intensivo (35 días):** la IA se realiza el día 4 post-parto (intervalo entre partos: en torno a 35 días).
- ❖ **Ritmo semi-intensivo (42 días):** la IA se realiza el día 11 post-parto (intervalo entre partos: en torno a 42 días).
- ❖ **Ritmo semi-extensivo (49 días):** IA a los 18 días post-parto (intervalo entre parto en torno a 49 días).
- ❖ **Ritmo extensivo (56 días):** IA a los 25 días post-parto (intervalo entre parto en torno a 56 días).
- ❖ **Ritmo extensivo (64 días):** IA a los 32 días post-parto (intervalo entre parto en torno a 64 días).

En los actuales sistemas de producción cíclicos, la tasa de fertilidad (número de conejas gestantes respecto al número de inseminadas) debe tenerse más en cuenta, si cabe, que la prolificidad de las mismas, ya que después de realizar la IA e inducir la ovulación con

GnRH, las hembras que no quedan gestantes tienen que esperar un tiempo improductivo hasta que las de su misma banda vuelven a parir. Esto es debido a que, después de la inducción de la ovulación, los cuerpos lúteos productores de progesterona se mantienen alrededor de 18 días, determinando un estado de pseudogestación (Alvariño y Ubilla, 1993; Rebollar, 1999). Por tanto, en el caso de que las inseminaciones se realicen una vez a la semana es necesario esperar 21 días para reinseminar de nuevo a una coneja que no ha quedado gestante.

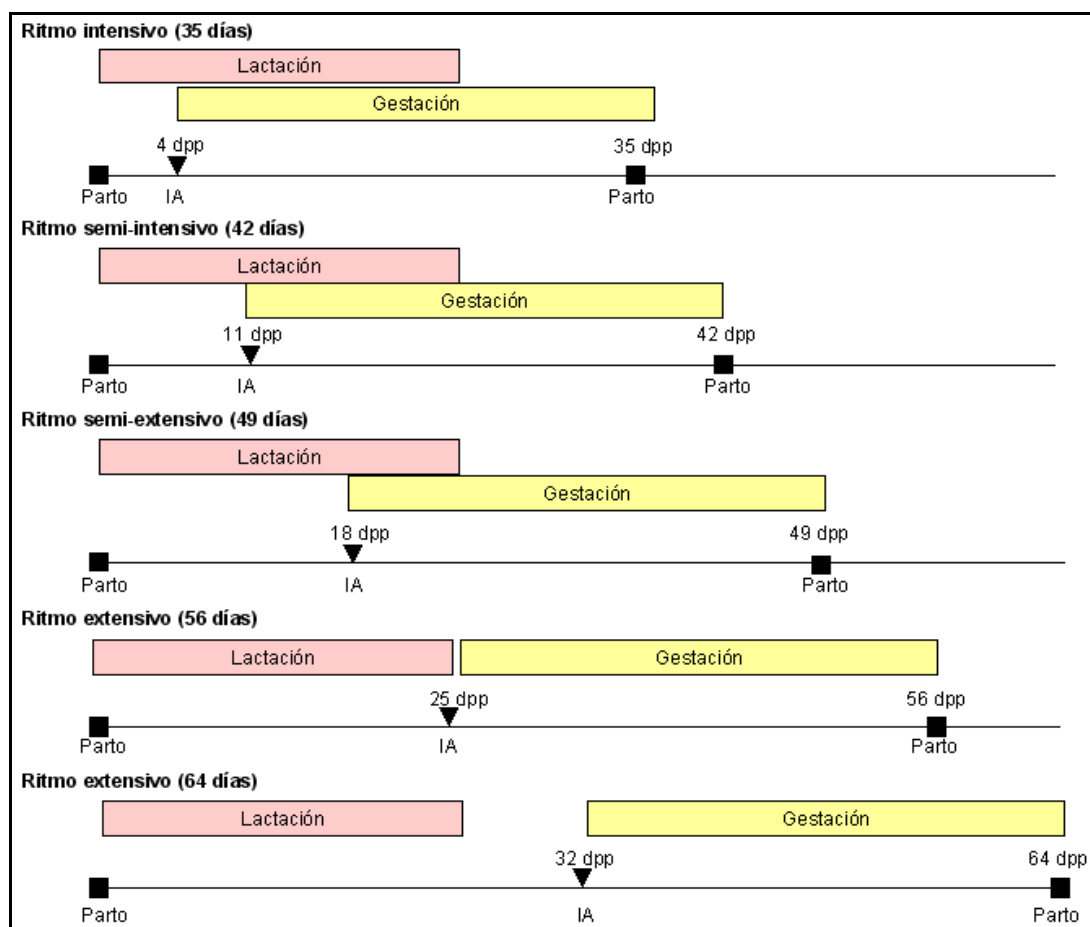


Imagen 2.1. Representación esquemática de los principales ritmos reproductivos utilizados en cunicultura, realizando destetes a 25 dpp. dpp: días post-parto; IA: inseminación artificial.

El manejo reproductivo más extendido actualmente en las explotaciones europeas es el semi-intensivo (IA día 11 post-parto), con lo que la mayoría de las hembras que se inseminan son lactantes. En la coneja, la lactación no anula completamente su actividad ovárica, ya que existen oleadas de crecimiento folicular durante todo el periodo post-parto (Díaz *et al.*, 1987; Ubilla y Rebollar, 1995). Sin embargo, la IA en las hembras en lactación compromete fuertemente la fertilidad y la prolificidad, sobre todo en la segunda inseminación, es decir, cuando las conejas son primíparas, lactantes y todavía continúan con su propio crecimiento, comparado con las conejas no lactantes o con las lactantes

múltiparas (Lamb *et al.*, 1991; Rebollar *et al.*, 2004; 2006a). Esto nos lleva a pensar que el efecto negativo de la lactación sobre la función reproductiva está mediado por la prolactina (Ubilla *et al.*, 2000a; 2000b); pero también, por el marcado déficit energético derivado de la producción de leche, de las necesidades de crecimiento de la coneja primípara y del solapamiento de la lactación y la gestación a partir del día 11 ó 18 post-parto (Xiccato *et al.*, 2005). Esto genera importantes pérdidas económicas en una explotación debidas a la ineficacia reproductiva de dicho grupo de animales.

2.1.1. Estatus metabólico y condición corporal durante el periodo post-parto en conejas lactantes

Los niveles de productividad de las conejas reproductoras son comparables a los obtenidos en otras especies domésticas. Así, la producción de leche por coneja alcanza 6,5 Kg/ lactación, para un tamaño medio de camada de 8 gazapos (De Blas *et al.*, 1995). Asumiendo un peso medio de la coneja de 4 Kg y 9 partos al año, esta producción equivaldría, a igualdad de peso, a 6900 Kg leche/ año en un animal de 500 Kg, como es una vaca. Por otro lado, la leche de coneja tiene una concentración elevada de nutrientes, conteniendo como media, un 13,7% de grasa y un 10,9% de proteína (De Blas *et al.*, 1995). Todo ello muestra el gran desgaste energético de este animal en esta etapa.

Además, como se ha descrito anteriormente la intensificación de la producción conlleva que las madres lactantes sean inseminadas poco después del parto previo, por lo tanto, este manejo, por un lado, no les permite recuperar las reservas corporales utilizadas en la gestación anterior para el crecimiento de los fetos (Young, 1979); y por otro, aumenta la demanda energética debida a su estatus lactante y a la gestación siguiente solapada con la lactación. Por lo tanto, aunque la capacidad reproductiva de la coneja es una de las más altas de todos los mamíferos domésticos, la utilización de este tipo de ritmos reproductivos hace que se mantenga continuamente en una situación de elevadas necesidades nutritivas que merman significativamente los resultados reproductivos en esta especie (Parigi-Bini *et al.*, 1992; Xiccato *et al.*, 2004; 2005).

Esta problemática se acentúa aún más durante la primera lactación, en la que la coneja no tiene la misma capacidad de ingestión de alimento que las hembras múltiparas para cubrir sus requerimientos energéticos. Esto le lleva a movilizar gran parte de sus reservas corporales, de hecho se ha descrito que moviliza alrededor del 52% de sus reservas grasas (ParigiBini *et al.*, 1992; Xiccato *et al.*, 1995; Pascual *et al.*, 2002). Está establecido que, durante este periodo, una madre pierde en torno a 300 g de grasa corporal y 10 MJ de

energía (Forthun-Lamothe *et al.*, 2002). Por el contrario, se ha observado que los ritmos extensivos reducen la concentración de agua corporal, mejoran el porcentaje de grasa de las canales y los balances energéticos llegan a equilibrarse en el momento de la inseminación (Xiccato *et al.*, 2005).

La disminución del aporte calórico nutricional y el balance energético negativo durante el post-parto generan alteraciones en la composición corporal que se reflejan en variaciones hormonales y metabólicas a nivel sanguíneo (Parigi-Bini *et al.*, 1990; Pascual *et al.*, 2002), afectando negativamente en el momento de la IA, tanto a la receptividad sexual como a la fertilidad de la coneja (Fortun-Lamothe, 2006) así como la de otras especies (vaca: Chagas *et al.*, 2007). Los momentos cercanos a la ovulación se consideran cruciales, en cuanto a que en ese periodo, un grupo complejo de hormonas y metabolitos están informando de algún modo al eje hipotálamo-hipófisis y al ovario del estado energético y lactacional que posee la hembra. Algunos nutrientes como las proteínas, los ácidos grasos no esterificados (NEFA, *Non Esterified- Fatty Acids*), u hormonas relacionadas con la cantidad de grasa corporal y la ingestión de alimento, como la leptina, están presentes en los folículos ováricos de distintas especies (ratona: Kawamura *et al.*, 2002; cerda: Craig *et al.*, 2004; vaca: Leroy *et al.*, 2005) y en el oviducto (ratona: Harris *et al.*, 2005), lo que podría estar influyendo en el desarrollo folicular, en la competencia del oocito y en la supervivencia del embrión (Sutton *et al.*, 2003). En otras especies, cada vez hay más evidencias de que las alteraciones endocrinas y metabólicas que se desencadenan durante el post-parto como consecuencia del balance energético negativo, afectan considerablemente a la calidad del oocito y del embrión, siendo éstos los factores principales que determinan la ineficacia reproductiva de los animales durante este periodo (Leroy *et al.*, 2008).

2.1.2. Factores séricos metabólicos y endocrinos relacionados con la condición corporal y la lactación

2.1.2.a. Proteínas séricas totales

En lo que se refiere al metabolismo proteico, los niveles séricos de proteínas en conejos se encuentran entre 5,4 y 7,5 g/ dL (Melillo, 2007). Factores como la edad o la gestación pueden alterar dichos valores. Según Deichmiller y Dixon (1960), cuando las conejas están gestantes las proteínas séricas de reserva del animal se agotan, reduciendo su concentración a niveles basales e incluso dando lugar a una hipoproteinemia marcada en el momento del parto. Además, según estos autores, cuando el animal no puede realizar bien la cecotrofia (ingestión de heces blandas directamente del ano) por su avanzado estado de

gestación, se reduce considerablemente la ingestión de una fuente de proteína muy importante que corresponde a un 25-30% del porcentaje de materia seca del cecotrofo (Kupersmith, 1998). La hipoproteinemia también se puede instaurar por deshidratación o por malnutrición crónica (Melillo, 2007).

La permeabilidad del folículo a las proteínas plasmáticas aumenta durante el desarrollo folicular, ya que se ha observado que existe una relación positiva entre el tamaño del folículo y la concentración de proteínas en el mismo (Sutton *et al.*, 2003). En particular, la concentración de albúmina en el líquido folicular es mayor que en el plasma de la mujer (Velázquez *et al.*, 1977). En este sentido, en algunas especies como en la cerda (Cia *et al.*, 1998) se ha sugerido que una disminución del porcentaje de proteína corporal afecta considerablemente a la capacidad reproductiva. Esto puede ser debido, entre otros factores, a que las alteraciones en las concentraciones de aminoácidos podrían estar ejerciendo un efecto negativo sobre la maduración citoplasmática *in vitro* del oocito (coneja: Chung *et al.*, 1974; cerda: Yang *et al.*, 2000; Hong y Lee, 2007). Además, varios autores han sugerido que los aminoácidos se encuentran entre los elementos más importantes que participan en la regulación del desarrollo embrionario, ya que son utilizados como fuente de energía y para la síntesis de proteína (mujer: Gardner y Lane, 1998; vaca: Lee *et al.*, 2004).

2.1.2.b. Ácidos grasos no esterificados (NEFA)

Hay que tener en cuenta que la actividad ovárica se optimiza cuando el animal tiene suficientes reservas energéticas principalmente de tejido adiposo, y posee una adecuada condición corporal lo que favorece la maximización de los rendimientos reproductivos de la coneja. En este sentido, el aumento de los niveles de algunos parámetros en sangre, como los NEFA, reflejan la movilización de los lípidos del animal, por lo que podrían ser un buen indicador del desequilibrio del balance energético (Walters *et al.*, 2002; Leroy *et al.*, 2005; Brecchia *et al.*, 2006) que se observa: a) al final de la gestación (debido a los requerimientos energéticos tanto del útero como de los fetos en crecimiento y por la reducción de la ingestión de alimento en los días que preceden al parto) y, b) cuando se solapan gestación y lactación (Fortun, 1994). En periodos de ayuno prolongado, los NEFA pueden aumentar incluso hasta tres veces por encima de los valores normales en la coneja (Brecchia *et al.*, 2006). Los niveles elevados de NEFA inducen un efecto pro-apoptótico sobre las células de la granulosa (Vanholder *et al.*, 2005), y también se han relacionado con la disminución de la calidad *in vitro* de oocitos bovinos (Leroy *et al.*, 2005), por lo que, se podrían considerar buenos indicadores del efecto que ejerce el balance energético negativo sobre la función ovárica (Walters *et al.*, 2002).

2.1.2.c. Leptina

A nivel endocrino, las concentraciones plasmáticas de leptina son también indicativas de las reservas energéticas y de la grasa corporal del animal (Chilliard *et al.* 2005; Fortun-Lamothe, 2006), ya que esta hormona se sintetiza principalmente por los adipocitos (Zhang *et al.*, 1994). El nombre de leptina deriva del griego *leptos* (que significa delgado) y su función principal parece ser la regulación del peso corporal (Coleman *et al.*, 1978; Friedman y Halaas, 1998), ya que cuando el animal presenta un adecuado nivel de engrasamiento se libera y actúa sobre el hipotálamo disminuyendo la ingesta y aumentando la tasa metabólica. Así, la expresión del gen de la leptina se estimula durante la ingesta de alimentos y disminuye durante el ayuno en la coneja (Brecchia *et al.*, 2006). La expresión y las concentraciones séricas son mayores en sujetos obesos que en delgados, existiendo una correlación positiva entre esta hormona y el índice de masa corporal en la especie humana (Keim *et al.*, 1998). Williams *et al.* (2002) relacionaron un descenso de los niveles de leptina en plasma motivado por la insuficiente cantidad de grasa en el organismo, con la incapacidad del animal para llevar a cabo la gestación. Además, se han descrito periodos críticos como el momento del parto en el que existe un significativo descenso de la leptinemia, indicando el claro gasto energético sufrido por las hembras gestantes a término (Nicodemus *et al.*, 2007). Por otro lado, también se ha descrito que los niveles séricos de leptina son bajos en la edad prepuberal (rata: Cheung *et al.*, 1997).

Así pues, estos estudios indican que la concentración de leptina forma parte de las señales endocrinas que relacionan la gestión de las reservas energéticas del animal -su condición corporal- con su función reproductora. En particular, esta hormona parece estar involucrada en la inhibición de la capacidad reproductiva cuando la condición corporal es deficiente o los individuos son obesos. Los primeros estudios al respecto se realizaron en ratonas modificadas genéticamente. Aquéllas que no expresaban el gen que codifica para la leptina, (*ob/ob*) o para su receptor (*db/db*) resultaron ser obesas (Zhang *et al.*, 1994) e infértiles; (Lee *et al.*, 1996). Las ratonas *ob/ob* sólo volvían a ser fértiles mediante la administración de leptina exógena, pero no mediante la restricción del alimento, lo cuál sugirió que la influencia de esta hormona en la reproducción es directa, sobre el eje hipotálamo-hipófisis (Boiti, 2004, Brechia *et al.*, 2006) y sobre la función ovárica a través de su unión con receptores específicos de membrana (Ob-R) (Tartaglia *et al.*, 1995).

Más adelante en esta memoria, se describen las bases fisiológicas establecidas en otras especies que detallan los posibles efectos de esta hormona sobre la función ovárica y en particular, sobre el desarrollo folicular y la maduración de los oocitos. Aunque en la coneja los datos al respecto son prácticamente inexistentes.

2.1.2.c. Prolactina

Por otro lado, y como ya se ha apuntado previamente, el efecto negativo de la lactación sobre la función reproductiva no es debido solamente al desgaste energético que conlleva en sí misma, sino también a las concentraciones séricas de prolactina (PRL) que se mantienen elevadas durante la lactación. La prolactina es una hormona secretada por la hipófisis, pero también por otros tejidos como la glándula mamaria, la placenta o el útero (Ben-Jonathan *et al.*, 1996). Para llevar a cabo sus acciones, esta hormona se une a receptores de membrana específicos; únicamente la unión de la PRL a la isoforma larga de su receptor induce la respuesta celular (Das y Vonderhaar, 1995). Durante la lactación, los niveles de PRL circulantes son elevados en respuesta a la succión de los gazapos, siendo indispensable para el mantenimiento de la lactogénesis. Sin embargo, la hiperprolactinemia ejerce un efecto antagonista sobre la función reproductiva de la coneja (Theau-Clement y Roustan, 1992; Fortun-Lamothe y Bolet, 1995). En este sentido, Rodríguez *et al.* (1989), observaron una respuesta menor de la LH a la GnRH en conejas lactantes, como consecuencia de una posible disminución en la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH, lo cual genera una reducción en la tasa de ovulación (Hamada *et al.*, 1980; Yoshimura *et al.*, 1992). Además, la PRL inyectada a conejas gestantes aumenta significativamente la mortalidad fetal (Fortun *et al.*, 1994), mientras que, la supresión de su secreción mediante bromocriptina aumenta el número de receptores ováricos a la LH (Kermabon *et al.*, 1994). A este nivel, la PRL parece estar directamente involucrada en los fenómenos de desarrollo y crecimiento folicular, en la modulación de la secreción esteroidea de las células de la granulosa (McNatty *et al.*, 1974; McNeilly *et al.*, 1982; Roy y Greenwald, 1988; Ubilla *et al.*, 2000b) y en la maduración *in vitro* de los oocitos de coneja (Yoshimura *et al.*, 1989). Por lo tanto, la mejora en la respuesta ovárica, respecto al desarrollo folicular y a la tasa de ovulación, a medida que avanza la lactación podría ser debida, entre otros factores, a que la tasa de PRL se reduce un 30% entre el día 14 y 18 de lactación (Fortun *et al.*, 1994) y un 38% entre el día 16 y 23 (Viard Drouet *et al.*, 1980). También, se ha sugerido que la respuesta y la sensibilidad de los tejidos a la PRL podrían estar determinadas por los niveles de expresión de su receptor, ya que podría existir una regulación temporal del mismo en función de la célula y de los niveles de PRL del animal (Jabbour y Kelly, 1997).

Por lo tanto, ambas situaciones (lactación y balance energético negativo), limitan el éxito reproductivo de la coneja especialmente en el momento de la segunda inseminación, el cuál depende, a su vez, del éxito progresivo de varios procesos fisiológicos como son la ovulación, la fecundación y la supervivencia embrionaria. El ovario es el órgano sobre el que actúan estos factores y su respuesta a los cambios metabólicos y endocrinos mencionados puede englobarse en un gran número de procesos relacionados con el grado de maduración

de los folículos y de sus oocitos antes de la ovulación y la fecundación, y con el desarrollo embrionario preimplantacional.

2.2. FISIOLÓGÍA OVÁRICA DE LA CONEJA

2.2.1. Oogénesis y desarrollo folicular

En la mayoría de los mamíferos, la oogénesis comienza durante la vida embrionaria y la transformación de las oogonias (células diploides) en oocitos (células haploides) se completa antes del nacimiento (Fair, 2003). En la coneja, la oogénesis se inicia al nacimiento y las oogonias comienzan la meiosis y se transforman en oocitos durante los primeros 10 días de vida (Peters *et al.*, 1965; Hutt *et al.*, 2006). En la tercera semana de edad, el ovario ya presenta folículos primordiales y folículos en desarrollo (Gondos, 1969; Hutt *et al.*, 2006), mientras que los primeros folículos antrales se detectan a partir de la 12ª semana de vida (Wolgemuth *et al.*, 1984; Hutt *et al.*, 2006). De esta forma, en las primeras semanas después del nacimiento, la coneja ya contará con la dotación de oocitos disponibles para el resto de su vida reproductiva. A partir de aquí, se producen oleadas de crecimiento folicular (foliculogénesis) y regresión (atresia) de manera constante, aunque el núcleo del oocito permanecerá detenido en el estadio de diplotene de la profase de la primera división meiótica, estadio nuclear que mantendrá hasta pocas horas antes de la ovulación (Sirard, 2001).

Sin embargo, a lo largo de la foliculogénesis, la maquinaria molecular del oocito está activa. El nucleolo presenta una estructura fibrogranular que refleja la actividad sintética del oocito durante su crecimiento (Sutovsky *et al.*, 1993). En este periodo, sintetiza y almacena grandes cantidades de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas que es a lo que se debe su aumento de tamaño (Motlik *et al.*, 1989). Además, aumenta el número de mitocondrias, se sintetizan los gránulos corticales y se forma la estructura del citoesqueleto, a través de la cual se distribuyen las organelas (Ferreira *et al.*, 2009). Debido a que, durante la maduración posterior no hay expresión génica en el oocito, todo el material sintetizado y almacenado durante el crecimiento es el que se utilizará para el metabolismo posterior tanto del oocito como del embrión. Luego, estos procesos que ocurren en el oocito son indispensables, no sólo para reiniciar y completar adecuadamente la maduración, sino también para asegurar la formación del cigoto y el desarrollo embrionario temprano hasta que se produce la activación del genoma embrionario que en la coneja tiene lugar en el estadio de 8 células (Telford *et al.*, 1990). A partir de ahí el embrión puede sintetizar nuevas

proteínas para mantener su propio desarrollo (Ferreira *et al.*, 2009). En la coneja, según Jelinkova *et al.* (1994), la mayoría de los folículos menores de 1 mm de diámetro contienen oocitos que no tienen competencia para llevar a cabo adecuadamente los procesos de desarrollo posteriores. Por lo tanto, la competencia del oocito aumentará, por lo general, con el tamaño del mismo y el diámetro folicular (Kruip y Dieleman, 1982; Jelinkova *et al.*, 1994). De hecho, los resultados de maduración *in vitro* mejoran cuando se utilizan aquellos oocitos que se encuentran dentro de folículos superiores a 1 mm y se realiza una selección de los mismos basada en criterios morfológicos de homogeneidad del citoplasma del oocito y de un cúmulo compacto. Los oocitos desnudos o con signos de vacuolización en el citoplasma, citolisis, necrosis o pérdidas de la conformación esférica se consideran degenerados, y por lo tanto, no aptos para la maduración *in vitro* (Jelinkova *et al.*, 1994; Lorenzo *et al.*, 1996a).

En condiciones *in vivo* para el desarrollo correcto tanto del oocito como de las células que lo rodean, durante la foliculogénesis y, también, durante el proceso de maduración posterior, son esenciales las uniones en hendidura ó uniones “gap” formadas por proteínas transmembrana llamadas conexinas (Kidder y Mhawi, 2002; Kennedy *et al.*, 2003). A través de ellas, se produce el intercambio bidireccional de una gran cantidad de señales como son: nutrientes, precursores metabólicos, hormonas y factores de crecimiento (Sutton *et al.*, 2003). Todos ellos ejercen estímulos tanto positivos como negativos entre el oocito y las células del cúmulo (Van der Hurk y Zhao, 2005). Sin embargo, la regulación precisa de la foliculogénesis y los mecanismos de supervivencia del folículo y del oocito *in vivo* no se conocen del todo en la coneja.

Durante la foliculogénesis se pueden definir folículos en cinco estadios morfológicos, que a su vez, se pueden agrupar en relación al momento en el que se forma el antro folicular en: folículos preantrales (primordiales, primarios y secundarios) y antrales (terciarios y preovulatorios) (Imagen 2.2):

❖ **Folículo primordial.** El oocito se encuentra rodeado de una capa de células planas conectadas entre sí y al oocito mediante las uniones “gap”, las cuales permiten el intercambio de pequeñas moléculas, señales y nutrientes (Kidder y Mhawi, 2002; Kennedy *et al.*, 2003). El diámetro del folículo y del oocito en este estadio en la coneja está en torno a 30-44 μm (Pincus y Enzmann, 1935; Hutt *et al.*, 2006).

❖ **Folículo primario.** El folículo tiene un diámetro de unos 100-120 μm (Pincus y Enzmann, 1935; Hutt *et al.*, 2006). Las células foliculares planas que rodean al oocito en crecimiento se transforman en una capa de células cúbicas. El oocito de la coneja experimenta un gran crecimiento llegando a medir alrededor de 60 μm .

❖ **Folículo secundario o preantral.** El folículo mide unos 200 μm de diámetro medio (Pincus y Enzmann, 1935). Consta de un oocito que alcanza casi su tamaño máximo (80-104 μm), con dos o más capas de células de la granulosa alrededor que se multiplican rápidamente; comienzan a desarrollarse las células de la teca y su vascularización (Kranzfelder *et al.*, 1984; Macchiarelli *et al.*, 1992).

❖ **Folículo terciario o antral.** Estos folículos en la coneja tienen un diámetro superior a 200-250 μm según distintos autores (Fleming *et al.*, 1984; Kranzfelder *et al.*, 1984; Jelinkova *et al.*, 1994; Hutt *et al.*, 2006). Aparecen espacios ocupados por líquido folicular, producidos por el metabolismo de las células foliculares, los cuales van formando una cavidad llamada antro folicular. El oocito crece hasta unos 133-135 μm (Jelinkova *et al.*, 1994) y presenta de seis a nueve capas de células de la granulosa (Alvaríño, 1993).

❖ **Folículo preovulatorio o de Graff.** En la coneja, estos folículos tienen un diámetro superior a 800-900 μm (Kranzfelder *et al.*, 1984) y el oocito mide entre 140-143 μm (Jelinkova *et al.*, 1994). El antro aumenta de tamaño y acumula gran cantidad de factores de crecimiento, hormonas peptídicas y esteroideas, proteínas, metabolitos energéticos y otras sustancias desconocidas (Sutton *et al.*, 2003). Las células de la teca interna y externa están completamente formadas. Durante este periodo, el oocito apenas aumenta su tamaño (Pincus y Enzmann, 1935; Eppig, 2001) produciéndose el crecimiento de los folículos antrales principalmente por el acúmulo de líquido folicular (Bonhoff y Adams, 1985; Van der Hurk y Zhao, 2005).

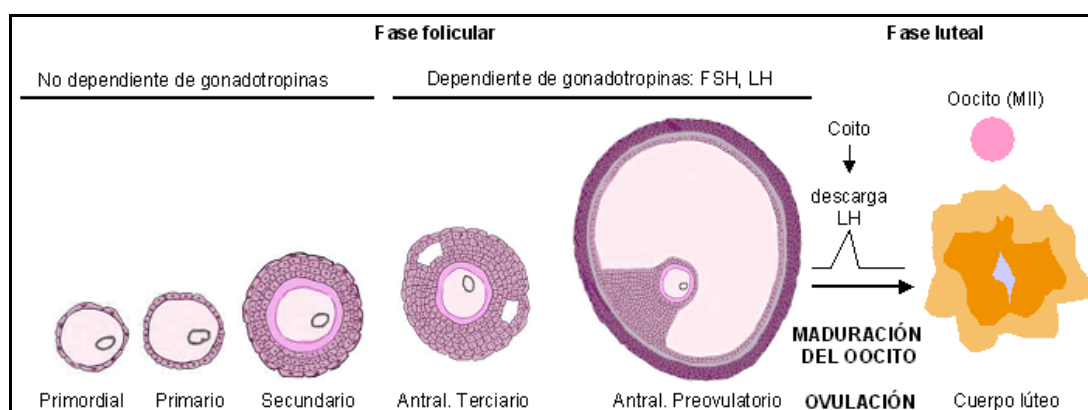


Imagen 2.2. Representación esquemática del desarrollo folicular y la ovulación. Adaptado de Mermillod *et al.*, 1999.

En la coneja adulta, el tiempo medio que tardaría un folículo primario en alcanzar el tamaño preovulatorio sería de 97 días (Mariana *et al.*, 1989). Si no se produce el coito, las oleadas de desarrollo y regresión folicular son constantes siendo la dinámica habitual del ovario.

Éstas, se desarrollan y regresan en intervalos en torno a 10 días (Hill y White, 1933), coincidiendo con un tamaño folicular que va desde los 450 μm -folículos antrales medianos-, hasta que llegan al estadio preovulatorio (Díaz *et al.*, 1987). Esto supone que los ciclos se superponen parcialmente cada 4-6 días. La acción tanto de la hormona folículo estimulante (FSH, *Follicle Stimulating Hormone*) como de la LH es esencial para el desarrollo de dichos folículos antrales. Ambas gonadotropinas estimulan la esteroidogénesis ovárica a través de sus receptores. Las células de la granulosa expresan receptores para la FSH y poseen actividad aromatasa, enzima que cataliza la síntesis de 17- β estradiol a partir de la androstenodiona y testosterona procedente de la teca (con receptores para la LH) (Erickson y Ryan, 1975; 1976). Por ello, los niveles de 17- β estradiol intrafolicular normalmente aumentan de manera considerable a medida que aumenta el tamaño de los folículos antrales sanos (Lefèvre y Caillol, 1978). A su vez, el pico de la LH provoca la luteinización de las células de la granulosa del folículo preovulatorio y éstas comienzan a sintetizar predominantemente progesterona en vez de estradiol (Van der Hurk y Zao, 2005). Teniendo en cuenta que, las células del cúmulo son indispensables para la actividad transcripcional del oocito durante la foliculogénesis (Eppig, 2001), así como, para su crecimiento y maduración (Lorenzo *et al.*, 1996a), la alteración de los niveles de estradiol y progesterona en el folículo preovulatorio durante el post-parto pueden afectar dichos procesos (Beker *et al.*, 2002).

En particular, durante el periodo post-parto, Díaz *et al.* (1987), señalaron que aparecía una primera oleada folicular al final de la gestación, coincidiendo con la caída de los niveles de progesterona circulantes en los días 29 y 30 de la misma. Estas oleadas alcanzan su máximo desarrollo en torno al día 3 y 9 post-parto (Díaz *et al.*, 1987; Ubilla y Rebollar, 1995) y después del destete, estando relacionadas con el aumento en la producción de 17- β estradiol en el folículo y con la receptividad sexual (Lefèvre y Caillol, 1978; Molina *et al.*, 1986). Teniendo en cuenta esta premisa en cunicultura se han tratado de establecer los momentos mas óptimos para la IA y los ritmos reproductivos más adecuados. No obstante, un nivel plasmático de 17- β estradiol determinado no puede predecir con exactitud el nivel de receptividad sexual en esta especie (Rebollar *et al.*, 1992), debido a su extremada variabilidad individual sobre todo durante la lactación (Ubilla y Rebollar, 1995). En este sentido, la acción inhibitoria de la prolactina sobre el desarrollo folicular podría estar determinada por la interferencia que ejercería esta hormona sobre la esteroidogénesis inducida por la FSH en el folículo, o por la depresión directa sobre la secreción de FSH en la hipófisis (Bachelot y Binart, 2007). En ganado vacuno también se ha demostrado que las hembras lactantes poseen folículos dominantes menos estrogénicos que las no lactantes (Sartori *et al.*, 2004).

Además, el balance energético negativo en este periodo reduce la frecuencia y la amplitud de la pulsabilidad de la LH (Brecchia *et al.*, 2006). Respecto a los factores metabólicos descritos anteriormente, los diferentes niveles de expresión del receptor de la leptina a lo largo del desarrollo folicular en la cerda (Craig *et al.*, 2004), parecen indicar que esta hormona ejerce un efecto directo, negativo o positivo, en la esteroidogénesis, foliculogénesis y oogénesis (Brannian y Hansen, 2002) en función del estatus nutricional y la reserva de grasa corporal de las hembras. Asimismo, las concentraciones elevadas de los NEFA durante el periodo post-parto, ejercerían un efecto citotóxico en las células de la granulosa, lo que merma la calidad del folículo ovárico (Vanholder *et al.*, 2005). La capacidad esteroidogénica y la calidad de los folículos preovulatorios pueden estar, además, determinadas por el ambiente bioquímico y endocrino previo y mantenido durante un periodo prolongado de tiempo que se ha descrito en la vaca de al menos 80 días (Britt, 1992). Esto implica que estados fisiológicos alterados en un momento determinado de la vida reproductiva de una hembra pueden también afectar a medio o largo plazo a la calidad de los folículos, de los oocitos preovulatorios y, por lo tanto, del embrión preimplantacional (Britt, 1992; Mc Evoy *et al.*, 2001).

2.2.2. Atresia folicular

La atresia folicular (del término griego que significa *a* = no, *tresos* = perforación) es un proceso degenerativo por el cuál los folículos ováricos son eliminados durante su crecimiento de forma fisiológica mediante procesos de apoptosis o muerte celular programada (Tilly *et al.*, 1971).

A nivel bioquímico, en la muerte celular por apoptosis existe un programa genético que es indispensable para que ésta ocurra. El balance entre las señales pro- y anti-apoptóticas, determina el destino final de la célula. Cualquiera que haya sido el mecanismo de activación de la cascada de apoptosis, finalmente desencadena la activación de caspasas efectoras, como la caspasa 3, que es la responsable de iniciar las señales que promueven la liberación de una ADNasa activada por caspasa, responsable de la fragmentación internucleosómica del ácido desoxiribonucleico (ADN) proporcionando uno de los cambios bioquímicos característicos de este proceso (Hardy, 1999; Hussein, 2005).

Estos fenómenos pueden ser detectados morfológicamente, ya que las células en vía de apoptosis presentan cambios en el citoplasma y el núcleo que fueron descritos por primera vez por Kerr *et al.* (1972). La membrana nuclear y el núcleo se desintegran en fragmentos esféricos densos; asimismo, se activan endonucleasas dependientes de Ca^{2+} y Mg^{2+} , que degradan el ADN en fragmentos de 180 a 200 pares de bases (pb), aproximadamente, y sus

múltiplos (Peitsch *et al.*, 1993). La fragmentación del ADN representa un indicador importante de la existencia del proceso de apoptosis y constituye un marcador específico para su detección (Hussein, 2005). En el citoplasma, las organelas se conservan pero su organización y localización se altera. Sin embargo, los cambios que se producen a nivel mitocondrial son imperceptibles desde un punto de vista estructural.

Posteriormente, la membrana plasmática se rompe y forma vesículas que en su interior contienen organelas y ADN, y que reciben el nombre de cuerpos apoptóticos. Éstos son fagocitados por células vecinas (Henson *et al.*, 2001). Al contrario que en la necrosis, en la muerte por apoptosis no se presenta el fenómeno de inflamación o si se presenta, es casi imperceptible (Imagen 2.3).

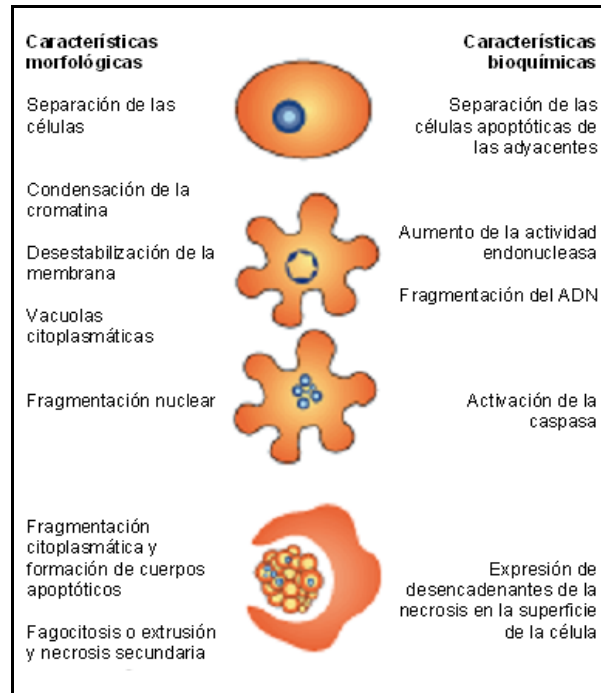


Imagen 2.3. Representación esquemática de los principales cambios bioquímicos y morfológicos que acontecen durante el proceso de apoptosis. Adaptado de Hardy, 1999.

La mayoría de los estudios que aportan evidencias de la importancia de la apoptosis en el ovario se centran en la degeneración específica que ocurre en las células de la granulosa (Palumbo y Yeh, 1994; Matikainen *et al.*, 2001). Las células de la granulosa de los folículos positivos a la técnica de TUNEL (detección In Situ de la apoptosis folicular) poseen las alteraciones bioquímicas, morfológicas y ultraestructurales implicadas en el proceso de apoptosis, descritas previamente (Hussein, 2005). En el ovario, la apoptosis folicular es un proceso que se produce continuamente, siendo la atresia el destino de la mayoría de los folículos (Tilly *et al.*, 1991). Las oleadas de crecimiento y regresión folicular constantes en la coneja, determinan que mientras los folículos antrales de un ciclo se encuentran en estado preovulatorio, antes de su regresión (atresia), comienza el crecimiento de los folículos de la oleada siguiente. Por lo que, el proceso de atresia en la población folicular antral es constante y elevado en esta especie (Kranzfelder *et al.*, 1984). En los fenómenos de desarrollo folicular y atresia se encuentran implicados factores reguladores locales y sistémicos que inhiben o promueven la presentación de apoptosis. Estudios recientes

realizados in vitro en células de la granulosa de la coneja, muestran que la FSH favorece no sólo el desarrollo de los folículos antrales sino que reduce la presentación de apoptosis, siempre y cuando se encuentren todas las estructuras propias del folículo (Maillet *et al.*, 2002; 2003). Por el contrario, la LH post-coital o las hormonas con acción análoga como la gonadotropina coriónica humana (hCG, human Corionic Gonadotropin) contribuirían al distanciamiento en el tamaño de los folículos dominantes seleccionados respecto a los subordinados en la coneja. Según Kranzfelder *et al.* (1984), aquellos folículos antrales subordinados con un diámetro alrededor de 700 µm se atresiarían cuando a las conejas se les administra hCG. En otras especies como la rata, se ha sugerido, que la susceptibilidad de los folículos antrales a la atresia podría ser debida a la adquisición de ADNasa, fenómeno que no ocurre en la población preantral (Boone *et al.*, 1995). Sin embargo, los mecanismos de dominancia y cómo éstos influyen en el número final de folículos preovulatorios no están del todo explicados.

Además, las alteraciones en las concentraciones plasmáticas de algunos factores metabólicos y hormonales asociados al balance energético negativo, también inducen procesos de apoptosis en las células de la granulosa, bien de manera directa (Almog *et al.*, 2001; Vanholder *et al.*, 2005; Hamm *et al.*, 2004) ó indirecta, modulando la esteroidogénesis (Swain *et al.*, 2004). En este sentido, los folículos que presentan un número elevado de células de la granulosa apoptóticas, secretan significativamente menos estradiol debido a que esas células pierden su actividad aromatasa (McNatty *et al.*, 1984). Estos folículos, contienen oocitos con una calidad reducida (Blondin y Sirard, 1995; Han *et al.*, 2006) lo que afecta, en último término, a la fertilidad (Leroy *et al.*, 2008). El oocito, a su vez, parece controlar la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa, su respuesta a las gonadotropinas, la esteroidogénesis, la diferenciación de las células de la teca y la expansión del cúmulo durante la ovulación (Lorenzo *et al.*, 1997; Van der Hurk y Zhao, 2005). Por lo tanto, la degeneración del oocito es un evento que inducirá, también, la apoptosis de las células de la granulosa y *viceversa*, lo que resulta en el fenómeno de atresia folicular.

2.2.3. Proceso de maduración del oocito

La maduración de los oocitos se refiere a dos sucesos biológicos diferenciados: a) la maduración nuclear, determinada por las modificaciones en la cromatina inicial; b) la maduración citoplásmica que, entre otros procesos, termina con la migración de los gránulos corticales (GC) hacia la periferia del oocito para impedir la polispermia (Ducibella *et al.*, 1993; Hoodbhoy y Talbot, 1994). Ambos procesos son la culminación del desarrollo

progresivo del oocito desde el inicio de la foliculogénesis y, a lo largo de ella, hasta la ovulación (Hyttel *et al.*, 1997).

2.2.3.a. Maduración nuclear

El paso previo a la ovulación del oocito consiste en la reducción de su material genético a la mitad (de $2n$ a n) mediante el proceso de la meiosis, dando lugar a dos células hijas haploides: el oocito propiamente dicho, que conserva casi la totalidad del citoplasma, y el corpúsculo polar que contiene prácticamente sólo la dotación cromosómica. Como ya se ha mencionado anteriormente, durante la oogénesis, el núcleo de los oocitos permanece quiescente aunque molecularmente activo, en el estadio de diplotene de la profase I, debido a que el oocito se encuentra bajo señales inhibitorias foliculares de la meiosis que mantienen el AMPc (Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) en su interior en concentraciones elevadas impidiendo que la maduración se reinicie (Schulz *et al.*, 1985; Yoshimura *et al.*, 1992). Esta fase se caracteriza por la presencia de una configuración nuclear prominente llamada vesícula germinal (VG) (Surovsky *et al.*, 1993). El pico preovulatorio de la LH desencadena la reanudación de la meiosis debido a la pérdida de las uniones "gap" entre el cúmulo y el oocito, a consecuencia de la expansión del cúmulo. Esto da lugar a una disminución de los niveles de AMPc, que desencadena la activación de ciertas proteínas quinasa del oocito, como son: el factor promotor de la meiosis (MPF, *Maturation Promoting Factor*) y, las proteínas quinasa activadas por mitógenos (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinases*) las cuáles, inducen el reinicio y la progresión de la meiosis (Liang *et al.*, 2007). Desde hace muchos años se sabe que este proceso también se desencadena de forma espontánea cuando el oocito es aislado del folículo (Pincus y Enzmann, 1935; Edwards, 1965; Nicosia y Mikhail, 1975).

El reinicio de la meiosis se identifica por la rotura de la membrana nuclear de la VG, la desaparición de los nucleolos y la condensación de los cromosomas que se alinean en la placa metafásica (metafase I). A continuación, se separan los pares de cromosomas homólogos y la meiosis progresa hasta el estadio de metafase de la segunda división meiótica (metafase II) acompañada por la extrusión del primer corpúsculo polar (Dekel, 2005). A este periodo se le conoce como maduración nuclear del oocito y es la forma en la que en condiciones normales ovula el gameto femenino de la coneja. (Imagen 2.4) El oocito permanece en estadio de metafase II en el oviducto hasta que se produce la fecundación. En ese momento se completa la meiosis produciéndose la extrusión del segundo corpúsculo polar.

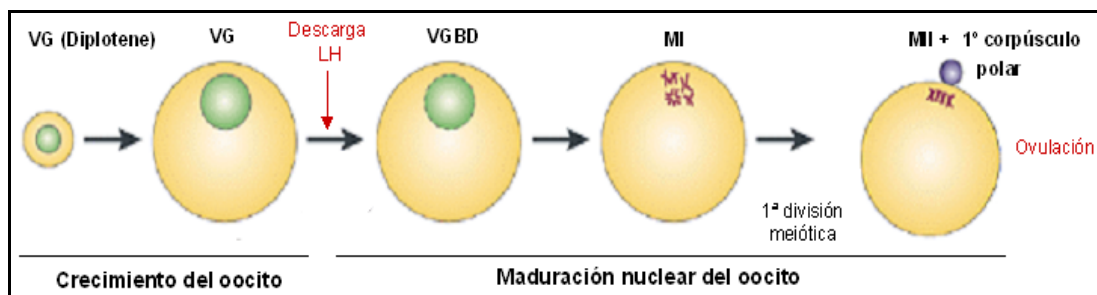


Imagen 2.4. Representación esquemática del proceso general de maduración meiótica del oocito de mamífero. Adaptado de www.epigenetics.co.kr/oocyte.gif.

En la coneja, el proceso de condensación de la cromatina, se produce al final del periodo de crecimiento de los oocitos, antes de que se reinicie la meiosis (Motlik *et al.*, 1989; Sutovsky *et al.*, 1993). Por lo que se pueden observar cromosomas condensados en menor o mayor grado en el interior de la VG en función del tamaño del folículo del que procedan. Así, los oocitos de folículos con un tamaño en torno a 1 mm de diámetro presentan cromosomas bivalentes en el interior de la VG (Jelinkova *et al.*, 1994).

Morfológicamente los estadios nucleares que se visualizan durante la maduración meiótica del oocito de la coneja son:

❖ **VG (Vesícula Germinal).** Con un núcleo rodeado por una membrana nuclear. Dentro de esta configuración, a su vez, se han descrito al menos dos estadios morfológicos en la coneja (Jelinkova *et al.*, 1994; Ju *et al.*, 2002):

- Núcleo caracterizado por la presencia de fibras de cromatina con un grado menor o mayor de condensación (Imagen 2.5A).
- Núcleo caracterizado por la presencia de cromosomas condensados previa a la rotura de la VG (Imagen 2.5B).

❖ **VGBD (Rotura de Vesícula Germinal).** Desaparece la membrana nuclear indicio de que se ha reanudado la meiosis.

❖ **M-I (Metafase I).** Los cromosomas bivalentes ($2n$) aparecen condensados al máximo en el ecuador del huso acromático (Imagen 2.5C).

❖ **Anafase/ Telofase I.** Los cromosomas homólogos se separan y avanzan hacia los polos del huso acromático.

❖ **M-II (Metafase II).** La mitad de los cromosomas homólogos (n) aparecen condensados en la placa metafásica. La otra mitad se encuentran dentro del primer corpúsculo polar extruído (Imagen 2.5D).

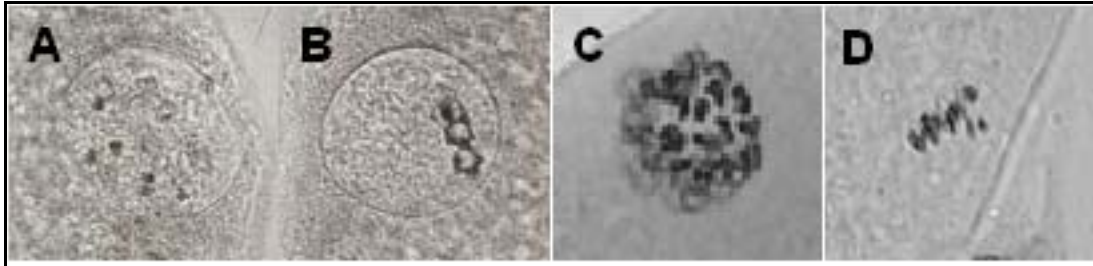


Imagen 2.5. Imagen de las principales configuraciones nucleares visualizadas con orceína acética a lo largo de la maduración nuclear de la coneja. A) vesícula germinal. B) Vesícula germinal con cromosomas condensados. C) Metafase I. D) Metafase II.

2.2.3.b. Maduración citoplasmática

El citoplasma del oocito juega un papel crucial en el ensamblaje de la maquinaria metabólica para la producción de la energía. Esta energía es necesaria para realizar las funciones celulares durante la maduración, fecundación y desarrollo embrionario temprano hasta la activación del genoma del embrión. La maduración citoplasmática es un proceso que implica modificaciones post-transcripcionales del ARNm acumulado durante la oogénesis y la re-localización y modificación de algunos orgánulos celulares del oocito (Ferreira *et al.*, 2009) (Imagen 2.6).

La síntesis proteica es crucial en los periodos de desarrollo (Van Blerkom y McGaughey, 1978). Durante la maduración, ésta aumenta aproximadamente tres veces desde el estadio de VGBD hasta el de MI. Cuando el oocito llega a MII, estos niveles vuelven a ser basales (Tomek *et al.*, 2002). Los principales transcritos producidos, codifican para las proteínas reguladoras del ciclo celular como son, entre otros, el MPF y las MAPK ya mencionadas anteriormente (Liang *et al.*, 2007), y para las proteínas que componen el sistema antioxidante enzimático, como el glutatión y peroxidasas, protegiendo al oocito frente a los radicales libres de oxígeno generados por el metabolismo mitocondrial hasta la activación del genoma embrionario (Ali *et al.*, 2003).

A nivel ultraestructural, se ha observado que, durante la maduración aumenta el número de copias de ADN mitocondrial y las mitocondrias viajan a través de los microtúbulos del citoesqueleto desde la periferia a la zona central del oocito. Aumenta el contenido lipídico y se reduce el aparato de Golgi. En oocitos de ratona, el retículo endoplasmático pasa de estar distribuido uniformemente por el citoplasma a acumularse en las regiones corticales.

Entre otras funciones, se encarga de regular el almacenamiento y la liberación de Ca^{2+} intracelular. Durante la fecundación, el retículo endoplasmático en la zona cortical libera una gran cantidad de Ca^{2+} implicado en la exocitosis del contenido de los gránulos corticales (Ferreira *et al.*, 2009). Los microfilamentos y los microtúbulos que componen el citoesqueleto están implicados entre otros procesos en la migración periférica, en la separación de los cromosomas, en el establecimiento de la polaridad en el oocito, en la extrusión del primer y segundo corpúsculo polar y, en la migración y exocitosis de los gránulos corticales de ratona (Sun y Schatten, 2006). Sin embargo, en la cerda, este proceso es independiente del citoesqueleto (Sun *et al.*, 2001).

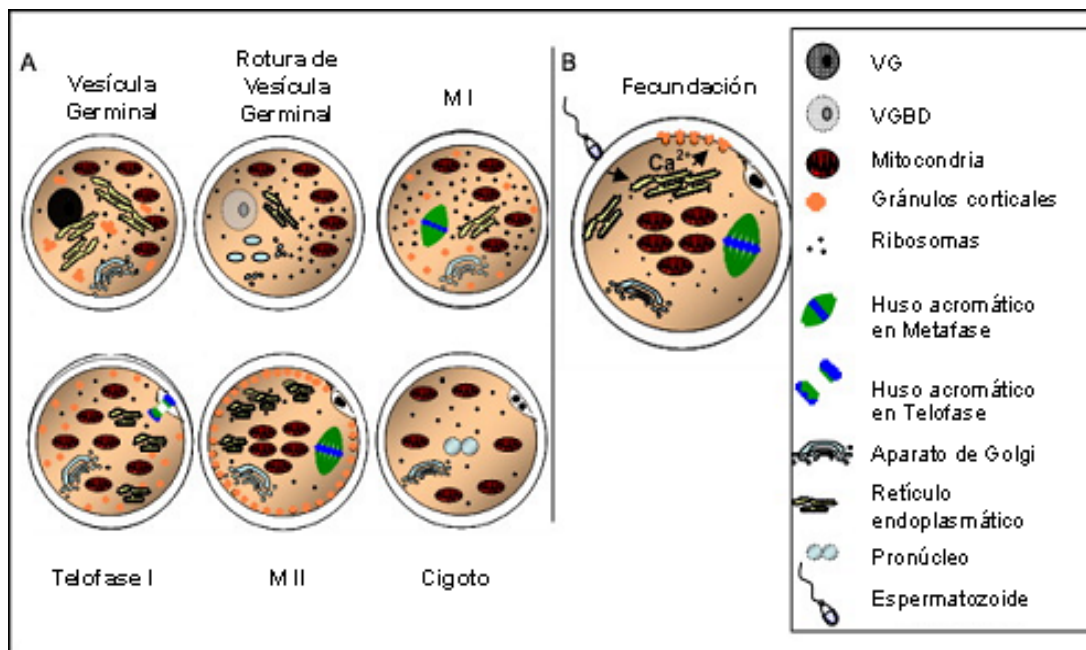


Imagen 2.6. Representación esquemática de la distribución de las organelas durante la maduración del oocito, la fecundación y el estadio de cigoto. A) Maduración meiótica y distribución de las organelas a lo largo de la maduración y la formación del cigoto. B) Distribución de las organelas y proceso de exocitosis del contenido de los gránulos corticales después de la fecundación. Adaptado de Ferreira *et al.*, 2009.

Los gránulos corticales (GC) son orgánulos esféricos de pequeño tamaño (entre 100 y 200 nm de diámetro) que están presentes exclusivamente en el citoplasma de los oocitos (Gulyas, 1974a; 1974b). Se forman a partir del aparato de Golgi durante la foliculogénesis (Hoodbhoy y Talbot, 1994). Están delimitados por una membrana simple que contiene residuos glicoproteicos (Gordon y Dandekar, 1976) y en su interior se almacenan sustancias de carácter fundamentalmente glicoproteico así como proteasas (Hoodbhoy y Talbot, 1994). La detección de los GC se puede realizar mediante microscopía electrónica o de fluorescencia. La utilización de lectinas unidas a fluorocromos para su localización fue utilizada primeramente en el ratón (Dubicella *et al.*, 1988) y el hámster (Cherr *et al.*, 1988) y,

posteriormente en las especies domésticas (Yoshida, 1993; Hosoe y Shioya, 1997; Carneiro *et al.*, 2002; Velilla *et al.*, 2004). Las lectinas son sustancias que tienen la propiedad de unirse selectivamente a determinados radicales glucídicos, por lo que son una herramienta útil para detectar compuestos gluco-conjugados que se encuentran en la membrana de los GC. En concreto, los GC de los oocitos de coneja son selectivamente detectados por la lectina LCA (aglutinina de la *lens culinaris*) que se une específicamente a los radicales que presentan el monosacárido α -D-Manosa (Hoodboy y Talbot, 1994).

Durante la maduración del oocito, se produce la migración de los gránulos corticales hacia la periferia (Gulyas, 1974a; 1974b), a través de su unión con proteínas de anclaje al citoesqueleto (cerda: Kim *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2001; erizo de mar: Wessel *et al.*, 2002), distribuyéndose en una monocapa por debajo de la membrana plasmática, preparándose así para el momento de la fecundación (Wang *et al.*, 1997a). El anclaje de los GC a la membrana, parece ser independiente de los microfilamentos y los microtúbulos (Sun *et al.*, 2001; Wessel *et al.*, 2002). En el erizo de mar, esta distribución de los GC puede mantenerse durante días, ó incluso meses en condiciones experimentales, sin producirse una exocitosis precoz (Wessel *et al.*, 2002). Sin embargo, en los oocitos de la coneja ovulados se han descrito, mediante estudios con microscopía electrónica, alteraciones en distintas estructuras del citoplasma a lo largo de las horas, así como una reducción en el número de gránulos corticales (Longo, 1974; Fléchon *et al.*, 1975).

La función principal de los gránulos corticales reside en su capacidad para bloquear la poliespermia durante la fecundación del oocito mediante la reacción cortical (Fraser *et al.*, 1972; Fléchon *et al.*, 1975). Ésta se genera en respuesta a la fusión del espermatozoide con el oolema mediada por una proteína G de membrana, lo que desencadena la activación de dos mensajeros secundarios: inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Esto da lugar a un aumento del Ca^{2+} intracelular procedente del retículo endoplásmico y a la activación de la proteína quinasa C (PKC) lo que produce la exocitosis del contenido de los gránulos corticales al espacio perivitelino, modificando la estructura de la zona pelúcida e inactivando los receptores específicos que reconocen y unen los espermatozoides (Ducibella *et al.*, 1993; Wassarman, 1994). La quinasa dependiente de calmodulina II, es otra de las moléculas implicadas en este proceso (Abbot y Ducibella, 2001) y en la maduración meiótica en la coneja (Henry *et al.*, 1997). De este modo, y rápidamente, se produce la “reacción de zona” o el “endurecimiento” de la zona pelúcida que impide la unión de nuevos espermatozoides y, en consecuencia, se bloquea la posibilidad de penetración múltiple (poliespermia). Este mecanismo de bloqueo está altamente conservado entre especies ya que la penetración de varios espermatozoides en el oocito da lugar a la formación de centriolos supernumerarios y a procesos de división aberrantes de los cigotos generando embriones no viables en las primeras divisiones mitóticas. En concreto, los GC de los

oocitos de coneja liberan gran cantidad de material manosilado o con residuos de glucosa (Gordon *et al.*, 1975). Esto generaría un gran número de cargas negativas en el espacio perivitelino, lo cual da lugar a una modificación del oolema y a una gran fuerza de repulsión para los espermatozoides (Cooper y Bedford, 1971), lo que podría contribuir al bloqueo de la poliespermia altamente eficiente que presenta esta especie (Braden y Austin, 1954; Oversteet y Bedford, 1974).

Las causas de poliespermia *in vitro* han sido atribuidas a una disfunción de la exocitosis de los GC, a un retraso en la migración periférica o a una distribución irregular de los mismos (Gulyas, 1974a; 1974b). Por lo tanto, la distribución de los GC se ha utilizado como criterio para la evaluación del grado de maduración citoplasmática alcanzado por el oocito en diferentes especies y consecuentemente para predecir el éxito de la fecundación posterior (Wang *et al.*, 1997b).

Durante la maduración citoplasmática del oocito, podemos encontrar principalmente las siguientes distribuciones de GC (Hosoe y Shioya, 1997; Carneiro *et al.*, 2002; Velilla *et al.*, 2004) (Imagen 2.7):

- ❖ **Distribución periférica.** Los GC están colocados justo debajo de la membrana plasmática. Este patrón periférico se correspondería con una maduración citoplasmática correcta del oocito.
- ❖ **Distribución cortical.** Los GC se encuentran en la región cortical separados de la membrana plasmática. Esta configuración se corresponde con oocitos que han iniciado la migración de los GC, pero ésta es incompleta.
- ❖ **Distribución homogénea/ difusa.** Los GC están distribuidos por la totalidad del citoplasma excepto en el espacio pericromosómico donde se encuentra la vesícula germinal. Esta distribución se corresponde con oocitos no maduros citoplásmicamente.
- ❖ **Distribución no homogénea.** Los GC aparecen distribuidos de forma anómala no siguiendo ningún tipo de patrón de distribución. Aparecen agregados de GC en el citoplasma. Esta configuración podría ser compatible con oocitos degenerados o de escasa calidad (Gulyas, 1974a; 1974b).

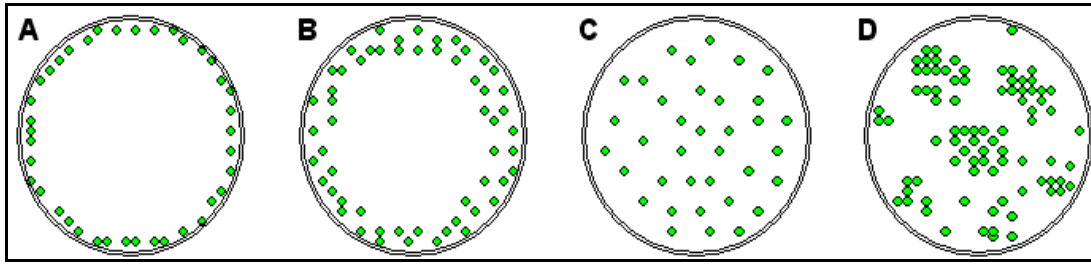


Imagen 2.7. Representación esquemática de los principales patrones de distribución de los gránulos corticales en el oocito. A) Periférica. B) Cortical. C) Difusa/ homogénea. D) No homogénea/anormal.

La migración de los GC está correlacionada en un alto porcentaje con el proceso de maduración nuclear (Velilla *et al.*, 2004). El fracaso de cualquiera de estos aspectos durante la maduración del oocito origina la imposibilidad de una fecundación correcta y del desarrollo embrionario posterior adecuado (Plachot y Crozet, 1992; Yang *et al.*, 1998; Sirard, 2001). Esto nos indica que para evaluar el grado de maduración del oocito, al menos, es interesante tener en cuenta ambos criterios; la migración periférica de los gránulos corticales acompañada de la presencia de metafase II.

2.2.3.c. Vías de señalización en el proceso de maduración: vía de las MAPK y las STAT3

Durante la maduración del oocito, los procesos de fosforilación y defosforilación en los complejos cúmulo-oocito regulados por proteínas juegan un papel fundamental en la progresión de la maduración, garantizando la respuesta adecuada del gameto al pico de la LH. Por lo tanto, la inhibición de estas proteínas o la presencia de niveles bajos de las mismas pueden afectar negativamente a la capacidad de maduración de los oocitos antes de la fecundación.

En el oocito, tanto de la coneja (Jelinkova *et al.*, 1994), como de otras especies (Gordo *et al.*, 2001), el MPF es la proteína quinasa conocida más importante implicada en el reinicio y la progresión de la meiosis (Dekel, 2005). En el erizo de mar, además, después de que se produzca la rotura de la vesícula germinal, el MPF parece ser el factor que estimula la asociación de los gránulos corticales (GC) a los microfilamentos, para ser transportados hacia la periferia (Wessel *et al.*, 2002). Sin embargo, el estímulo que genera el inicio de la migración de los GC, no se conoce adecuadamente en la mayoría de las especies.

Las MAPK son serina/ treonina quinasas que se activan por fosforilación en los residuos de treonina y tirosina (Nishida y Gotoh, 1993; Seger y Krebs, 1995; Pearson *et al.*, 2001). En el oocito, estas proteínas también son uno de los principales factores que regulan la maduración nuclear (Shibuya *et al.*, 1992; Gotoh y Nishida, 1995; Sun *et al.*, 1999). Así, se

ha descrito que las MAPK son las proteínas que promueven la activación del MPF, aunque estudios previos han revelado que la actividad de las mismas en el oocito aumenta horas después de la exposición a la LH, a continuación de la ruptura de la vesícula germinal (Verlhac *et al.*, 1993; 1994; Sun *et al.*, 2002) (Imagen 2.8).

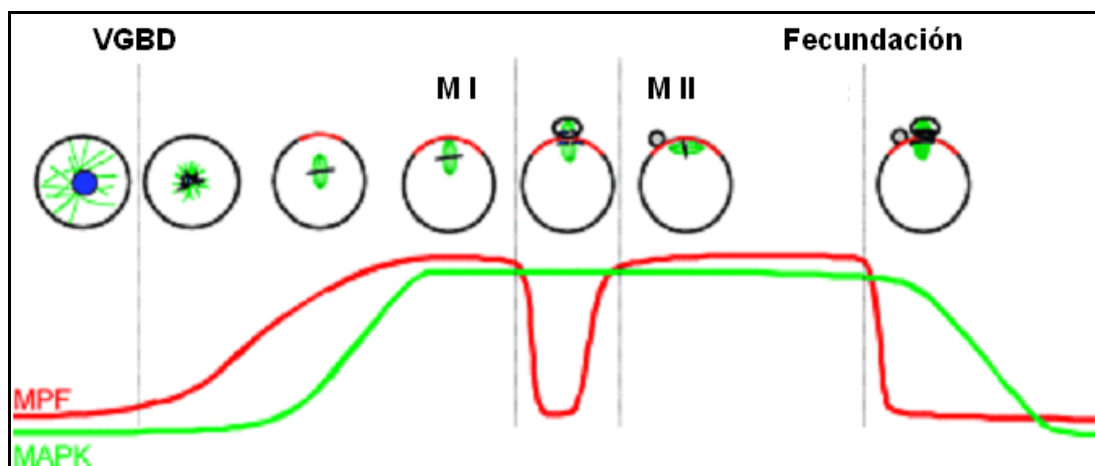


Imagen 2.8. Representación esquemática de los estadios de maduración nuclear en el oocito de ratona, y de la actividad conjunta del MPF y de las MAPK durante este proceso. La actividad del MPF, aparece representada en la línea verde y, la de las MAPK en la línea roja. Adaptado de Brunet y Maro, 2005.

En particular, en el oocito, se produce la activación de las quinasas MEK-1 y MEK-2 (*MAP kinase kinases 1-2*) que, a su vez, fosforilan a las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK-1 y ERK-2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinases*) (Verlhac *et al.*, 1993; 1994; Serger y Krebs, 1995; Sun *et al.*, 2002). Estas proteínas son un factor crítico en los procesos que acontecen después del reinicio de la meiosis, ya que regulan el ensamblaje de los microtúbulos y la organización del huso acromático, la progresión de M I a M II y la parada en M II hasta la fecundación tanto en la coneja (Yu *et al.*, 2002), como en otras especies (revisado por Liang *et al.*, 2007). Esto es debido a que las MAPK actúan sobre sustratos específicos, incluyendo proteínas implicadas en la formación de la membrana celular, condensación de la cromatina y formación del huso (Peter *et al.*, 1992; Verlhac *et al.*, 1994). Sin embargo, para que esto ocurra es necesario activar la cascada de señalización de las MAPK mediante señales extracelulares específicas. En este sentido, algunos estudios indican, además, que es fundamental que el citoplasma del oocito pueda fosforilar las MAPK para que se continúe la meiosis después de la ruptura de la vesícula germinal (Sun *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2001). Por lo tanto, la actividad de las MAPK en el oocito pueden ser también un importante marcador para evaluar su maduración citoplasmática (Sun *et al.*, 2001), ya que, además, estas proteínas están implicadas en la formación de la red de microfilamentos (Verlhac *et al.*, 2000), y por lo tanto, en la distribución de las organelas, en la reorganización cortical de las mismas y en el

establecimiento de la polaridad (Sun y Schatten, 2006). Las MAPK tienen sitios de unión con las proteínas reguladoras del Ca^{2+} durante la maduración (Henry *et al.*, 1997; Matson y Ducibella, 2007) pudiendo estar implicadas en los procesos de exocitosis de los granulos corticales y siendo necesarias para la formación de los pronúcleos en los oocitos activados partenogenéticamente (Posada y Cooper, 1992).

En lo que respecta a las células del cúmulo y de la granulosa, *in vivo*, la descarga preovulatoria de la LH es uno de los factores que desencadena la activación inmediata de las MAPK en dichas células. Éstas, a su vez, generan diferentes dispositivos intracelulares que conducen, entre otros procesos, a la ruptura de las comunicaciones intercelulares mediadas por las uniones “gap” debido a que se altera la estructura de la conexina 43, lo que genera una disminución del AMPc en el oocito de forma indirecta (Yoshimura *et al.*, 1992; Liang *et al.*, 2007). Los esteroides secretados por las células del cúmulo y de la granulosa, como consecuencia de la activación de las MAPK, podrían ser uno de los factores que actúan sobre el oocito de forma paracrina a través de sus receptores específicos (Holt *et al.*, 1981), inactivando la adenilato ciclasa y disminuyendo el AMPc. Esto desencadena, a su vez, la activación del MPF y de las MAPK en el oocito, induciendo así el reinicio y la progresión de la meiosis (Fukui *et al.*, 1982; Kaji *et al.*, 1987; Danforth, 1995). Sin embargo, estos mecanismos y los mediadores a través de los cuáles actúan, no están del todo clarificados presentando diferencias entre especies.

Por otro lado, los llamados factores JAK/ STAT3 (*Janus Kinases/ Signal Transducer and Activator of Transcription-3*) son miembros de la familia de las proteínas STAT, que pueden ser activados por una gran variedad de citoquinas, factores de crecimiento u hormonas (Akira, 1999; Liu *et al.*, *en prensa*). Como consecuencia de su activación, las quinasas de la familia JAK fosforilan, a su vez, las proteínas STAT; éstas, se dimerizan y se transportan al núcleo donde ejercen su actividad transcripcional, en la cuál, convergen múltiples mecanismos intracelulares de señalización (Levy *et al.*, 2002). Las secuencias que codifican los dominios funcionales presentan una alta homología entre especies diferentes (Hombria y Brown, 2002), lo que sugiere que la función de las proteínas STAT está altamente conservada en los mamíferos. En particular, la proteína STAT3 tiene un papel importante en la regulación del crecimiento, diferenciación y supervivencia celular, dependiendo del tipo de célula y del estímulo (Akira, 1999; Fedorcsak y Storeng, 2003). A nivel reproductivo, la información existente sobre la implicación de estas proteínas en el oocito es escasa (Matsuoka *et al.*, 1999; Bates *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha visto que las proteínas STAT3 se expresan en tejidos como el estroma ovárico, el oviducto y el endometrio, así como, en las células del cúmulo, en el oocito y en los embriones preimplantacionales (Antczak y Van Blerkom, 1997; Matsuoka *et al.*, 1999; Paula-Lopes *et al.*, 2007). Tanto en el oocito como en los embriones, las proteínas STAT3 parecen estar implicadas en la

determinación de la polaridad (Antczak y Van Blerkom, 1997) y, en el proceso de implantación (Nakamura *et al.*, 2006). Es más, después de la fecundación, Takeda *et al.* (1997), mostraron que en el ratón estas proteínas parecen ser imprescindibles para el desarrollo embrionario ya que la interrupción de la vía de las STAT3, es letal para los embriones siendo imposible obtener individuos adultos.

2.2.3.d. Esteroidogénesis de los complejos cúmulo-oocito (COC)

Como se ha descrito previamente, durante el desarrollo folicular la FSH estimula la aromatización de la testosterona en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios, siendo éstas las principales productoras de 17β -estradiol. Este efecto de la FSH sobre la producción de estradiol en las células de la granulosa también se ha demostrado *in vitro* (Schreiber *et al.*, 1980; Zachow y Magoffin, 1997). Por su parte, la descarga preovulatoria de la LH induce la diferenciación y luteinización de las células de la granulosa y del cúmulo en los folículos preovulatorios. Este proceso genera un cambio en el patrón de expresión de los genes esenciales para la esteroidogénesis que provoca que las células de la granulosa pasen a producir progesterona predominantemente durante la maduración del oocito constituyendo el 90% del contenido esteroideo intrafolicular en la vaca (Silva y Knight, 2000; Van der Hurk y Zao, 2005). Algunos autores han demostrado incluso que estas células adquieren espontáneamente la capacidad para secretar progesterona antes del pico de la LH cuando son aisladas del folículo preovulatorio (rata: Hillensjo *et al.*, 1981; ratona: Vanderhyden y McDonald, 1998; cerda: Channing *et al.*, 1981; Veldhuis *et al.*, 1982; mujer: Batta y Knudsen, 1980). Los hechos anteriores sugieren que la presencia de esteroides en el líquido folicular durante el periodo pre- o periovulatorio puede ejercer un efecto sobre la maduración del oocito *in vivo* (McNatty, 1978; Ainsworth *et al.*, 1980), ya que la alteración del equilibrio esteroideo ha demostrado dar lugar a peores tasas de maduración (Andersen, 1993).

Durante la maduración *in vitro*, los complejos cúmulo-oocito (COC) también tienen la capacidad de secretar esteroides, fenómeno observado en varias especies (mujer: Chian *et al.*, 1999; vaca: Mingotti *et al.*, 1995; 2002; cerda: Dode y Graves, 2002; 2003; oveja: Shirazi y Moalemian, 2007) incluida la coneja (Lorenzo *et al.*, 1997). El oocito puede, a su vez, modular la secreción esteroidogénica del cúmulo en condiciones *in vitro*, mediante la secreción de factores no del todo dilucidados (mujer: Tsutsumi *et al.*, 1982; Suzuki *et al.*, 1983; ratona; Vanderhyden and Tonary, 1995; cerda: Lucidi *et al.*, 2003; oveja: Shirazi y Moalemian, 2007). En este sentido, tanto el estradiol como la progesterona, ejercen su acción local sobre la maduración del oocito a través de sus receptores específicos localizados en las células del cúmulo y el oocito, de forma autocrina o paracrina (Naess,

1981; Park y Mayo, 1991; Danforth, 1995; Dode y Graves, 2003). Sin embargo, dichos efectos parecen ser específicos de especie (Moudgal *et al.*, 1996).

Aparte del efecto positivo del estradiol que muestran algunos estudios sobre el reinicio y progresión de la maduración meiótica (Fukui *et al.*, 1982; Danforth, 1995); a su vez, éste parece inducir oscilaciones en el Ca^{2+} intracelular del oocito procedente del retículo endoplasmático mejorando la maduración citoplasmática en algunas especies (vaca: Younis *et al.*, 1989; Sirotkin, 1992; mujer: Tesarik y Mendoza, 1997) y la fecundación en la coneja (Yoshimura *et al.*, 1987). Según lo descrito en el apartado anterior las proteínas MAPK, podrían estar a su vez implicadas en este proceso. Por lo tanto, probablemente el estradiol participa en el bloqueo de la poliespermia mediado por los gránulos corticales, como se ha sugerido previamente en la vaca (Karlach, 1987). Sin embargo, otros autores no han encontrado ningún efecto de este esteroide sobre la maduración (Lieberman *et al.*, 1976; Moor, 1988; Sun y Moor, 1991; Palter *et al.*, 2001; Dode y Graves, 2003; Shirazi y Moalemian, 2007), o incluso se ha descrito un efecto negativo al mantener el oocito en parada meiótica (Barret y Powers, 1993; Mingotti *et al.*, 1995) y dar lugar a anomalías cromosómicas y del huso (Can y Semiz, 2000; Beker *et al.*, 2002).

La luteinización de las células de la granulosa que hace que secreten progesterona principalmente durante la maduración del oocito, indica que esta hormona también podría estar ejerciendo alguna influencia en este proceso. Se ha sugerido que también estaría implicada en la activación del MPF (Bhattacharyas *et al.*, 2007), en la reducción del proceso de apoptosis en las células de la granulosa (Peluso *et al.*, 2001) y en la poliadenilación del ARNm materno regulando la expresión genética en el oocito (Ferreira *et al.*, 2009). La progesterona parece estimular el reinicio de la meiosis (Maller y Krebs, 1980; Bhattacharyas *et al.*, 2007) y la maduración citoplasmática (Hartshorne, 1989). Sin embargo, otros autores han descrito que esta hormona no ejercería dicho efecto sobre la maduración del oocito ni en la rata (Shalgi *et al.*, 1979) ni en la coneja (Yu *et al.*, 2006).

Por lo tanto, las interacciones entre diferentes factores hormonales o metabólicos relacionados con las reservas energéticas de los animales y los COC pueden dar lugar a variaciones en la secreción de estradiol y progesterona e indirectamente afectar a la maduración del oocito (McNatty *et al.*, 1979; Andersen, 1993; Lorenzo *et al.*, 1997; Ferguson *et al.*, 2003). Estudios previos también indican, que las gonadotropinas, los factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal growth factor*) y el factor de crecimiento similar a la insulina tipo-I (IGF-I, *Insuline growth factor I*) entre otros, estimulan de forma autocrina y paracrina la maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos de varias especies en condiciones *in vitro* y, de manera altamente específica, en la coneja (Lorenzo *et al.*, 1994; 1996b; Lonergan *et al.*, 1996). Además, existe una clara

influencia de estos factores sobre el proceso esteroidogénico del complejo cúmulo-oocito durante la maduración (Lorenzo *et al.*, 1997).

2.2.4. Ovulación y formación del cuerpo lúteo

Como se ha puntualizado previamente, en la coneja la ovulación es inducida por el coito. El pico preovulatorio de la LH que se produce como consecuencia, alcanza su nivel máximo entre una hora y media y dos horas después del mismo (Mills y Gerardot, 1984; Pau *et al.*, 2000). La ovulación de los oocitos se produce en ambos ovarios, a las 12 horas aproximadamente tras la descarga preovulatoria de la LH. Por lo tanto, en esta especie, este momento es fácilmente controlable mediante tratamientos hormonales con agentes análogos de la GnRH en el caso de que se realicen procedimientos de IA. Tras la ovulación, las células de la granulosa y de la teca del folículo luteinizadas dan lugar al cuerpo lúteo productor de progesterona. Éste no se forma completamente hasta pasados 6 días en la coneja, y los niveles máximos de progesterona se alcanzan a los 12-13 días, declinando progresivamente durante los últimos días de gestación (Stoufflet y Caillol, 1986; Rebollar *et al.*, 1992). A su vez, la presencia de los embriones en el útero ejerce una acción antiluteolítica durante toda la gestación, ya que impiden la producción de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PG_{F_{2\alpha}}$) por parte del endometrio, aunque se requiere un mínimo de dos embriones implantados para que la gestación pueda proseguir (Hafez, 1968).

2.3. DESARROLLO EMBRIONARIO PREIMPLANTACIONAL

Los oocitos maduros son fecundados en la ampolla del oviducto alrededor de 2 horas después de la ovulación. A partir de este momento comienza el periodo preimplantacional del embrión, el cuál evoluciona desde el estadio de cigoto hasta el de blastocisto pasando por estadios morfológicos de desarrollo diferentes: embrión pre-compactado, mórula y blastocisto (Imagen 2.9).

El desarrollo embrionario preimplantacional *in vivo* se caracteriza por una división celular rápida y un aumento de tamaño durante los primeros días después de la fecundación comparado con el desarrollo *in vitro* (Seidel, 1976; Kane, 1987). Los cigotos progresan por el oviducto llegando al cuerno uterino ipsilateral alrededor de las 75 horas después de la ovulación, en el estadio de mórula o blastocisto temprano. Ya que, la coneja presenta un útero doble con dos cuernos uterinos independientes, los embriones se implantan en fase de blastocisto en el cuerno uterino ipsilateral a los 7 días.

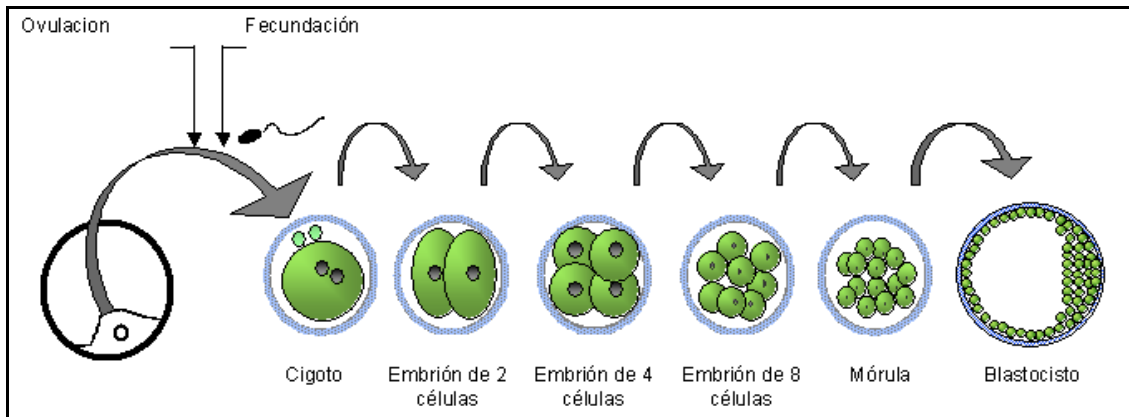


Imagen 2.9. Representación esquemática de la fecundación y del desarrollo embrionario preimplantacional hasta el estadio de blastocisto. Adaptado de Lonergan et al., 2003.

Otra característica diferencial de la coneja, es que las secreciones oviductales forman una capa de mucina (Seidel et al., 1976; Carney y Foote, 1990), formada por mucopolisacáridos que rodea a los embriones a su paso por el oviducto a partir de las 20 horas post-coito (Braden, 1952; Boving, 1957) (Imagen 2.10).

Debido a esta cubierta, la zona pelúcida permanece intacta hasta el momento de la implantación, no produciéndose la eclosión o “hatching” del blastocisto *in vivo* de forma fisiológica (Denker y Gerdes, 1979). Sin embargo, mientras se produce la expansión del blastocisto, la zona pelúcida se va digiriendo hasta que desaparece alrededor del día 6 de gestación, es decir, un día antes de la implantación del embrión (Kane, 1975).



Imagen 2.10. Imagen de un blastocisto de coneja rodeado de la capa de mucina.

La presencia de la capa de mucina y su grosor (mínimo de 20 μm) son dos factores necesarios para la implantación correcta del embrión (Murakami e Imai, 1996). Los cigotos se pueden desarrollar en ausencia de la capa de mucina hasta el estadio de blastocisto en condiciones *in vitro*. Además, la zona pelúcida de estos embriones se puede romper produciéndose la “eclosión” del blastocisto; aunque algunos autores no consideran este fenómeno como realmente fisiológico en la coneja (Kille y Hamner, 1973).

Los estadios morfológicos de desarrollo del embrión pre-implantacional que se describen en la coneja son los siguientes:

❖ **Embrión pre-compactado:** durante este periodo se inicia la división celular y se activa el genoma embrionario. Trabajos previos realizados en lagomorfos, han determinado que la primera división del cigoto ocurre en el oviducto entre las 22-25 horas post-coito, y que el genoma embrionario se activa en el estadio de 8 células (Telford, 1988). Los embriones de una célula no presentan aún capa de mucina.

❖ **Mórula:** alrededor de las 50 horas post-coito, se pueden diferenciar embriones en estadio de mórula temprana (16 células), mórula compacta (32 células o más) o mórula cavitada (aparición de una pequeña cavidad que dará origen al blastocele). La compactación se considera un fenómeno imprescindible para el proceso de cavitación posterior en el cuál se produce la entrada de agua y Na^+ que permiten que se forme una cavidad en el seno del embrión y que es una de las características del siguiente estadio embrionario (Overstrom *et al.*, 1989).

❖ **Blastocisto:** después de la cavitación de la mórula, en torno a las 70 horas post-coito, los embriones se desarrollan a blastocisto; entran en un proceso de crecimiento y expansión que da lugar dos tipos de poblaciones embrionarias: el trofoblasto y el botón embrionario separados por el blastocele (Benos *et al.*, 1985). Es en este periodo cuando disminuye el grosor de la zona pelúcida, para que el embrión se pueda implantar adecuadamente.

Los procesos de folículogénesis, desarrollo y maduración del oocito están estrictamente controlados por múltiples factores para generar un oocito competente capaz de ser fecundado correctamente para que dé lugar a un embrión viable. En este sentido, el número de embriones desarrollados en el periodo preimplantacional depende principalmente de la competencia de los oocitos, que a su vez dependerá del ambiente folicular del que procedan *in vivo* o de las condiciones del medio de maduración *in vitro*. Sin embargo, la calidad de los blastocistos, que determinará la capacidad de supervivencia de los mismos, está influida principalmente por el ambiente oviductal *in vivo*, o por las condiciones del cultivo después de la fecundación *in vitro* (Rizos *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2003; 2006). En particular, durante el periodo post-parto, el folículo, el oocito y el embrión están expuestos a cambios metabólicos y endocrinos debidos al déficit energético y a la lactación que pueden comprometer su viabilidad afectando a la tasa de fertilidad en último término (Leroy *et al.*, 2008).

2.4. ESTRATEGIAS DE MANEJO REPRODUCTIVO

2.4.1. Efecto del método de sincronización de estro sobre la fisiología reproductiva de las conejas lactantes

De forma sistemática las conejas lactantes no sincronizadas tienen porcentajes de fertilidad más bajos que las no lactantes (Rebollar *et al.*, 2004; 2006a). Sin embargo, en la mayoría de las granjas europeas la IA se realiza en el día 11 post-parto. En este momento existen una gran cantidad de factores interrelacionados que afectan a la competencia del oocito y a la fertilidad. Para solventar este problema, es necesario la utilización de diversos métodos de sincronización de estro que estimulen el desarrollo folicular, la secreción de estradiol y que desencadenen un estado de receptividad sexual favorable en el momento de la IA, para inducir de forma adecuada la ovulación y mejorar los parámetros reproductivos (Castellini, 1996; Rebollar *et al.*, 2006a; 2006b). Esta pauta de manejo es especialmente importante en conejas primíparas ya que son el grupo de animales en los que la fertilidad se ve más reducida (Theau-Clement y Lebas, 1996; Rebollar *et al.*, 2006a). La sincronización del estro permite además concentrar el manejo reproductivo en bandas, cuando se utiliza la técnica de IA, mejorando la eficacia de la misma.

2.4.1.a. Tratamientos hormonales

Como ya se ha descrito previamente, el crecimiento de los folículos antrales es gonadotropo-dependiente, es decir, está sujeto al aporte de FSH y LH que reciban. Para estimular la respuesta ovárica y el desarrollo folicular, una de las técnicas que más se emplea en conejas multíparas durante el periodo post-parto es la administración de gonadotropina coriónica equina (eCG, *equine Corionic Gonadotropin*). La eCG cuya acción es similar a la FSH (70%) y a la LH (30%), se administra en dosis única debido a su vida media prolongada (Siddiqui *et al.*, 2002). En general, una dosis de 25 UI de eCG 48 horas antes de la IA estimula el desarrollo folicular en las últimas fases sin inducir superovulación, mejorando la fertilidad de las conejas primíparas hasta un 30% y de las multíparas lactantes (Bourdillon *et al.*, 1992; Rebollar *et al.*, 2006a). En conejas multíparas, las dosis estándar de eCG (25 UI) estimula la maduración *in vitro* de sus oocitos comparado con conejas lactantes no estimuladas (García-García *et al.*, *en prensa*). Sin embargo, otros autores han descrito que dosis menores de eCG (de 5 a 20 UI), aunque estimulan proporcionalmente el desarrollo de un mayor número de folículos, en contrapartida, disminuyen el desarrollo embrionario temprano (Bonanno *et al.*, 1990). A su vez, los tratamientos de superovulación empleados en otras especies con análogos de la FSH incrementan la tasa de atresia en

cerdas (Guthrie *et al.*, 1990) e inducen la ovulación de oocitos estructuralmente anómalos y por lo tanto, de calidad comprometida (vaca: Assey *et al.*, 1994; oveja: O'Callaghan *et al.*, 2000).

Por otro lado, la utilización reiterada de eCG en conejas conlleva problemas sanitarios de residuos en la canal y de coste económico, ya que se genera una respuesta inmune a esta hormona (Lebas *et al.*, 1996), disminuyendo considerablemente su eficacia reproductiva (Rebollar *et al.*, 2006a; 2006b); aunque esta respuesta es muy variable e individual. En ocasiones, sólo se observan mejoras significativas con este tratamiento respecto a un lote testigo, cuando existen problemas de fertilidad, como es el caso de las conejas primíparas (Rebollar *et al.*, 2006). Además, tiene el grave inconveniente de que cada vez son mayores las restricciones a su uso, debidas a la exigencia –de acuerdo con la política ganadera de la Unión Europea- de evitar el consumo de carnes de animales tratados con preparados hormonales (Directiva 96/22/EC del 29 de abril de 1996) y al rechazo de los consumidores. A nivel productivo se ha demostrado que este método de sincronización hormonal podría ser sustituido por métodos no hormonales redundando en beneficios sanitarios y de ahorro económico para las granjas cunícolas (Alvariño *et al.*, 1998; Rebollar *et al.*, 2006a; 2006b).

2.4.1.b. Tratamientos no hormonales: bioestimulación

Como alternativa al tratamiento hormonal con eCG se han desarrollado métodos de sincronización de estro basados en el manejo del animal y evitando el uso de hormonas. Son los llamados métodos de bioestimulación (revisados por Theau-Clément, 2000). En el caso de las conejas lactantes, uno de los métodos más empleados es la separación transitoria de la camada o destete transitorio durante un periodo corto de tiempo, previo a la IA (Alvariño *et al.*, 1998). Este manejo genera una reducción de los niveles séricos de prolactina, disminuyendo así el efecto inhibitorio que ejerce esta hormona en la función reproductiva. De esta forma, mejora la secreción de FSH y los mecanismos relacionados con la actividad folicular y esteroidogénica ovárica que aumentan la receptividad sexual, el pico de la LH y la fertilidad en conejas lactantes bioestimuladas en el momento de la IA (Ubilla *et al.*, 2000a; 2000b; Rebollar *et al.*, 2008). Una separación transitoria de la camada durante 48 horas provoca una reducción del peso de los gazapos al destete (Bonanno *et al.*, 2000; 2004) y un aumento de la mortalidad (Rebollar *et al.*, 2004; 2006). Teniendo en cuenta que las conejas tienen la particularidad de que sólo amamantan a sus gazapos una vez al día durante unos pocos minutos y preferentemente en las primeras horas de la mañana, la tendencia, por tanto, es emplear separaciones de camada más cortas, de 24 horas, que eviten que el gazapo pierda ninguna lactación o simplemente retrasarla por unas horas hasta el momento de la IA. Estudios previos sobre los perfiles hormonales de la coneja muestran que un destete transitorio durante 24 horas es suficiente para inducir el

estro y mejorar la fertilidad de las conejas lactantes (Castellini *et al.*, 1998; Cano *et al.*, 2005; Rebollar *et al.*, 2006a), especialmente durante la primera lactación (Maertens, 1998; Bonanno *et al.*, 2002). En este sentido, en otras especies se ha descrito que los cambios endocrinos cercanos al momento de la IA pueden determinar la competencia del oocito previa al pico preovulatorio de la LH que determinen el éxito de los procesos de fecundación y desarrollo embrionario posteriores (Hytel *et al.*, 1997; Sirard *et al.*, 2006).

2.4.2. Efecto del intervalo parto-inseminación sobre la fisiología reproductiva de las conejas lactantes

Como se mencionó anteriormente, al igual que ocurre en otras especies, las necesidades nutricionales de las conejas de alta producción son elevadas porque sufren un desgaste considerable ya que no llegan a cubrir sus requerimientos energéticos a pesar de movilizar parte de sus reservas corporales (Lamb *et al.*, 1984; Partridge *et al.*, 1986; Parigi-Bini *et al.*, 1992; Xiccato *et al.*, 1995; 1996; Fortun-Lamothe y Prunier, 1999). Por lo tanto, otro de los factores a tener en cuenta para mejorar el balance energético de estos animales es la elección de un ritmo reproductivo apropiado que maximice el rendimiento y mejore la productividad teniendo en cuenta las particularidades fisiológicas de las conejas (Cervera *et al.*, 1993; Xiccato *et al.*, 2005). En el caso de las hembras primíparas en lactación, el déficit negativo es el principal responsable de una disminución de su eficacia reproductiva.

Las conejas lactantes no sincronizadas e inseminadas en torno al día 11 de lactación son más fértiles que las inseminadas a los 3 ó 4 días (Rebollar *et al.*, 1992). Éstas últimas aunque presentan una elevada receptividad sexual, que coincide con una oleada de crecimiento folicular (Díaz *et al.*, 1987), presentan una menor tasa de ovulación y de oocitos fecundados (Torres *et al.*, 1977; Lamb *et al.*, 1991). Esto puede ser debido, entre otras causas, a que en torno al día 4 de lactación las hembras tienen un número elevado de folículos preovulatorios que no responden a la inyección de GnRH y, por lo tanto, no ovulan. En la práctica, se ha comprobado que la intensificación de la producción mediante la utilización de estos ciclos reproductivos no presenta ventajas frente a la cubrición 11 días post-parto, ya que generan un agotamiento energético de las conejas, aumentando considerablemente la tasa de reposición, con lo que el número de gazapos destetados por coneja y año es similar en ambos casos. Así, en un estudio realizado a largo plazo por Rebollar *et al.* (2006a; 2006b), en el que se aplicó un ritmo intensivo durante 9 ciclos, se observó que el intervalo medio entre partos fue de 45 días, similar al que se conseguiría con la inseminación en día 11 post-parto, que es de 42 días. Aunque la productividad de las conejas sometidas a ritmos semi-intensivos es superior a las que siguen ritmos intensivos

(Rebollar *et al.*, 2009), la fertilidad de las conejas primíparas lactantes inseminadas en el día 11 post-parto sigue siendo muy reducida (50-60%) comparado con la obtenida en nulíparas y múltiparas (80-90%) (Castellini *et al.*, 2003; Rebollar *et al.*, 2009). Esto es debido a que aunque la IA el día 11 post-parto es un protocolo adaptado a la producción cíclica, no tiene en cuenta las peculiaridades fisiológicas de las conejas primíparas, ya que merman sus reservas energéticas, disminuyendo la calidad de los oocitos cuando éstas llevan múltiples gestaciones (García-García *et al.*, *en prensa*). La tasa de reposición sigue siendo elevada (Rebollar *et al.*, 2009), lo que implica una disminución la duración de la vida productiva de las madres reproductoras, ya que muchas de ellas mueren antes de destetar una tercera camada (Cervera *et al.*, 2006). La prolongación de la vida útil de las conejas es deseable no sólo desde el punto de vista del bienestar del animal, sino también para compensar los gastos que ocasiona la hembra durante la cría.

Por lo tanto, el ritmo reproductivo elegido debe maximizar el rendimiento y la productividad de los animales teniendo en cuenta las particularidades fisiológicas de los mismos, al menos en la segunda inseminación cuando las necesidades energéticas son elevadas y el rendimiento reproductivo reducido (Xiccato, 1996). En este sentido, los ciclos reproductivos extensivos, en los que se insemina a las hembras después del destete, permiten una mejor recuperación de las madres primíparas al no tener que soportar el gasto energético ocasionado por su crecimiento, la gestación y la lactación simultáneos desde el día 11 post-parto (Feugier y Fortun-Lamothe, 2006). En otras ocasiones estos mismos animales pueden pasar a un ritmo extensivo, para facilitar el manejo. Las hembras tendrían que ser inseminadas en la banda de las negativas a la IA anterior, que han pasado su periodo de pseudogestación, es decir, en el día 32 post-parto (11 días desde el parto hasta la IA, más 21 días del periodo de pseudogestación). Con este ritmo, previamente al momento de la IA, los gazapos ya han empezado a alimentarse con pienso sólido y se ha reducido paulatinamente el consumo de leche, incluso se pueden haber destetado. De hecho, la inseminación de los animales en periodos más avanzados de lactación mejora los parámetros reproductivos (Velasco *et al.*, 2008; 2009). Sin embargo, los ritmos extensivos siempre se han considerado poco rentables, ya que se incrementa el intervalo entre partos, aunque, los parámetros reproductivos, el número de gazapos y la duración de la vida productiva puede mejorar (Xiccato *et al.*, 2005; Castellini *et al.*, 2006). Incluso la alternancia de ritmos intensivos con extensivos (conejas inseminadas el día 1 post-parto y después del destete, respectivamente) parecen reducir el déficit energético y la tasa de reposición anual de madres, cuando se compara con un ritmo semi-intensivo fijo (IA siempre en el día 11 post-parto) (Castellini *et al.*, 2003).

En ganado vacuno, se ha determinado además que las condiciones relacionadas con el post-parto temprano afectan a los parámetros endocrinos y a la calidad de los oocitos, lo

cuál es especialmente pronunciado en la primera lactación (Domínguez, 1995; Snijders *et al.*, 2000; Walters *et al.*, 2002; Leroy *et al.*, 2005). Sin embargo, en lagomorfos los estudios realizados en conejas primíparas han tenido como objetivos sólo parámetros productivos sin profundizar en el conocimiento de la fisiología reproductiva que expliquen lo que acontece en las condiciones señaladas (Fortun-Lamothe y Prunier, 1999; Xiccato *et al.*, 2004; 2005; Castellini *et al.*, 2006).

2.5. ESTRATEGIAS DE MANEJO NUTRICIONAL

2.5.1. Efecto de la nutrición sobre la fisiología reproductiva de las conejas lactantes

Dado que la reproducción es una de las funciones vitales que demandan más energía, como ya se ha descrito, un desequilibrio nutricional repercute de inmediato en ella. En este sentido, por ejemplo, condiciones extremas como un ayuno de 24-48 horas eleva los niveles plasmáticos de NEFA, pero disminuye las concentraciones de leptina, la descarga preovulatoria de LH y la respuesta esteroidogénica del ovario, lo que afecta negativamente tanto a la receptividad como a la fertilidad de conejas multíparas inseminadas el día 11 post-parto (Brecchia *et al.*, 2006).

Si se trata de las conejas primíparas lactantes, el desequilibrio nutricional es más marcado debido a que presentan una capacidad de ingestión menor respecto a las multíparas. Por lo tanto, y de acuerdo con los condicionantes reproductivos, se han descrito una serie de pautas de alimentación que tratan de maximizar la productividad en las explotaciones para ayudar a incrementar los rendimientos sobre todo de las conejas primíparas. Algunas de éstas se basan en adaptar programas de alimentación específicos, como aumentar la densidad energética de la dieta (Fortun-Lamothe, 1997; Fernández-Carmona *et al.*, 2000; Pascual *et al.*, 2003; Xiccato *et al.*, 2004) o la capacidad de ingestión de las conejas (Nicodemus *et al.*, 1997; 2007; Xiccato *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2002). En esta Memoria nos centraremos en las segundas estrategias principalmente.

2.5.1.a. Manejo nutricional durante la recría

Los conejos son animales herbívoros con ciertas particularidades en su tracto digestivo. La velocidad de tránsito digestivo de la fracción fibrosa es elevada por lo que requieren cantidades de fibra en su dieta más altas, respecto a otros rumiantes, para prevenir problemas digestivos y asegurar un consumo óptimo de alimento (De Blas *et al.*, 1999;

Gidenne, 2003). Además, las necesidades nutricionales de los animales varían en función de la edad y del estado fisiológico en el que se encuentren. Por lo tanto, las estrategias de alimentación que se pueden aplicar a las conejas de recría son fundamentales para sentar las bases de una vida productiva más o menos larga y rentable. Sin embargo, estas conejas de recría son normalmente alimentadas de la misma manera que las madres lactantes. Se ha considerado que una posible solución a los problemas de déficit energético en las conejas primíparas sería aumentar su capacidad de ingestión cuando se les suministra un pienso más concentrado durante la lactación. Para ello, se han utilizado piensos muy fibrosos durante su crecimiento en recría (Xiccato *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2002; Nicodemus *et al.*, 2007). Las dietas fibrosas tienen la ventaja de que se pueden suministrar cómodamente *ad libitum*, y como suelen tener menor contenido energético, no hay riesgo de engrasamiento (Xiccato *et al.*, 1999). Además, del nivel de fibra, el tipo de fibra es importante en cuanto a los efectos sobre la digestión y los rendimientos de las conejas reproductoras. En particular, la administración de tipos de fibra baratos e indigestibles, como la lignina, parece aumentar el consumo de pienso de estos animales y el tamaño del tracto digestivo de forma económica (Nicodemus *et al.*, 1999; Gidenne, 2003). Para ello es necesario aportar como mínimo un 5,9% de lignina ácido detergente/ materia seca (LAD/ MS) (Nicodemus *et al.*, 1999). Esto es debido a que la lignina dificulta la degradación de la fibra y disminuye el tiempo de retención del alimento en el tracto digestivo (Gidenne y Perez, 1994; García *et al.*, 1999). Sin embargo, los resultados sobre el consumo, el balance energético y la eficacia reproductiva durante la primera lactación de la utilización de fibra en las dietas de recría son contradictorios (Nizza *et al.*, 1997; Xiccato *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2002). En otras especies se ha descrito que, las alteraciones bioquímicas y metabólicas mantenidas un periodo más o menos prolongado de tiempo pueden modificar el ambiente folicular, determinando la competencia del oocito preovulatorio, su capacidad esteroidogénica y el ambiente oviductal a largo plazo (Britt, 1992; Leroy *et al.*, 2008). Sin embargo, los trabajos realizados acerca de los sistemas de manejo de la recría en la coneja (Rommers *et al.*, 2002; 2004; Bonanno *et al.*, 2004), no han estudiado la respuesta en el desarrollo del propio ovario, y en ninguno se ha intentado correlacionar con parámetros endocrinos y metabólicos, como se ha hecho en otras especies (Boland *et al.*, 2001; Cavestany *et al.*, *en prensa*).

Dentro de esos parámetros metabólicos, la leptina, parece ser uno de los factores endocrinos que participan en la maduración del oocito y que están íntimamente relacionados con el estatus energético de la coneja (Fortun-Lamothe, 2006).

2.6. INFLUENCIA DE LA RESERVA ENERGÉTICA SOBRE EL OOCITO DE LA CONEJA: LEPTINA

La leptina es una hormona proteica de 16 kDal altamente conservada y producto del gen de la obesidad (gen *ob*) que, como se ha mencionado anteriormente, se sintetiza principalmente por los adipocitos (Zhang *et al.*, 1994) por lo que, sus concentraciones reflejan la cantidad de depósitos grasos del individuo, modulando, entre otras, la función ovárica y en particular, la calidad del oocito.

En las células de la granulosa del ovario y en el oocito de diferentes especies se ha detectado el receptor de la leptina (Ob-R) lo que indica que la unidad folículo-oocito puede responder directamente a los niveles de leptina mediante su receptor específico (Matsuoka *et al.*, 1999; Kawamura *et al.*, 2002; Craig *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Van Tol *et al.*, 2008). Estudios previos realizados en ratas han mostrado que la leptina en concentraciones elevadas reduce la incidencia de apoptosis folicular (Almog *et al.*, 2001) y en las ratonas *ob/ob* la deficiencia de esta hormona se ha asociado a retrasos en la foliculogénesis y a aumentos en la atresia folicular (Hamm *et al.*, 2004). Trabajos recientes se han enfocado en el estudio del efecto de la leptina sobre el proceso de maduración de los oocitos, mostrando que esta hormona también puede actuar como modulador de la competencia del mismo a través de la activación de mecanismos intracelulares específicos (Matsuoka *et al.*, 1999; Craig *et al.*, 2004; Van Tol *et al.*, 2008). Los resultados al respecto son contradictorios en algunos casos (Swain *et al.*, 2004; Suzuki *et al.*, 2009) e inexistentes en el caso de los lagomorfos. La influencia de la leptina sobre la correcta maduración del oocito, en relación a los depósitos grasos de los individuos, puede tener implicaciones importantes en la respuesta de los gametos femeninos a los tratamientos de fertilidad influyendo en el éxito, de algún modo, de las técnicas de reproducción asistida.

El Ob-R es miembro de la clase I de la superfamilia de los receptores de las citoquinas y producto del gen de la diabetes (gen *db*) (Tartaglia *et al.*, 1995). Tiene seis isoformas que poseen el mismo dominio extracelular y transmembrana. Sin embargo, se diferencian entre sí por la longitud y secuencia del dominio intracitoplasmático dando lugar a una isoforma larga (Ob-Rb), cuatro isoformas cortas (Ob-Ra, c, d, f) y un receptor soluble (Ob-Re), éste último sin dominio transmembrana (Frühbeck, 2006). Los dominios intracitoplasmáticos de las isoformas larga y cortas son los responsables de la activación de diferentes señales intracelulares a las que dan lugar la unión de la leptina con su receptor y a través de las cuáles la leptina modula la función celular (Imagen 2.11).

Los tipos de Ob-R no se distribuyen por igual en el organismo, dando lugar a acciones celulares diferentes. Así, la forma larga del Ob-R predomina en el hipotálamo, pero también se encuentra presente en los tejidos periféricos (Tartaglia *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Bjorbaek *et al.*, 1997), y se cree que es la que regula la mayoría de las señales de la leptina.

El Ob-R largo posee todos los dominios implicados en la señalización intracelular y es capaz de activar tanto factores de transcripción STAT3, como la vía de las MAPK (Lee *et al.*, 1996; Bjorbaek *et al.*, 1997) a través de la proteína quinasa JAK2. Las isoformas cortas del Ob-R se expresan de forma mas abundante en los tejidos periféricos y, en particular, en el ovario de la especie humana (Karlsson *et al.*, 1997). La señal mediada se transmite mediante la vía de las MAPK exclusivamente. Especialmente, las MAPK denominadas MEK-1 y MEK-2, son las que aparecen de forma más abundante en los complejos cúmulo-oocito de la especie bovina (Van Tol *et al.*, 2008) (Imagen 2.12).

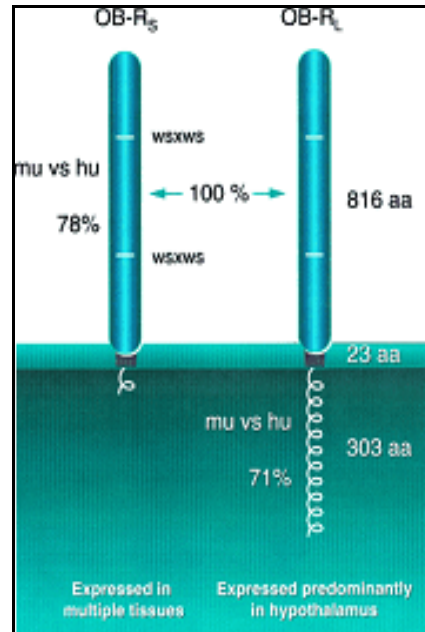


Imagen 2.11. Isoformas corta y larga del receptor de la leptina. Tomado de Tartaglia, 1997.

A nivel periférico, se ha propuesto que el efecto de la leptina se ejerce a través de los escasos Ob-R con la isoforma larga, que se expresan a niveles biológicamente insignificantes (Karlsson *et al.*, 1997). Apoyando esta hipótesis, algunos estudios han descrito que el efecto de la leptina sobre la maduración *in vitro* de los oocitos se realizaba a través de la activación de la señal de las STAT3 en el oocito de la ratona (Matsuoka *et al.*, 1999) y en el cúmulo de la vaca (Paula-Lopes *et al.*, 2007). Algunos autores incluso han sugerido que solo la forma larga del Ob-R tiene capacidad de señalización (Ghilardi *et al.*, 1996). Sin embargo, se ha demostrado que si se interrumpe la vía de las STAT3, los ratones son obesos pero fértiles (Bates *et al.*, 2003); por lo tanto, otras vías de señalización alternativas como la cascada de las MAPK podrían ser importantes a nivel reproductivo. En este sentido, Craig *et al.* (2004), demostraron que la leptina inducía la fosforilación de las MAPK y, por lo tanto, la maduración *in vitro* de los oocitos de la cerda. Sin embargo los resultados al respecto son escasos en la literatura en lo que se refiere al oocito, controvertidos y específicos de especie o dependientes del medio de cultivo utilizado.

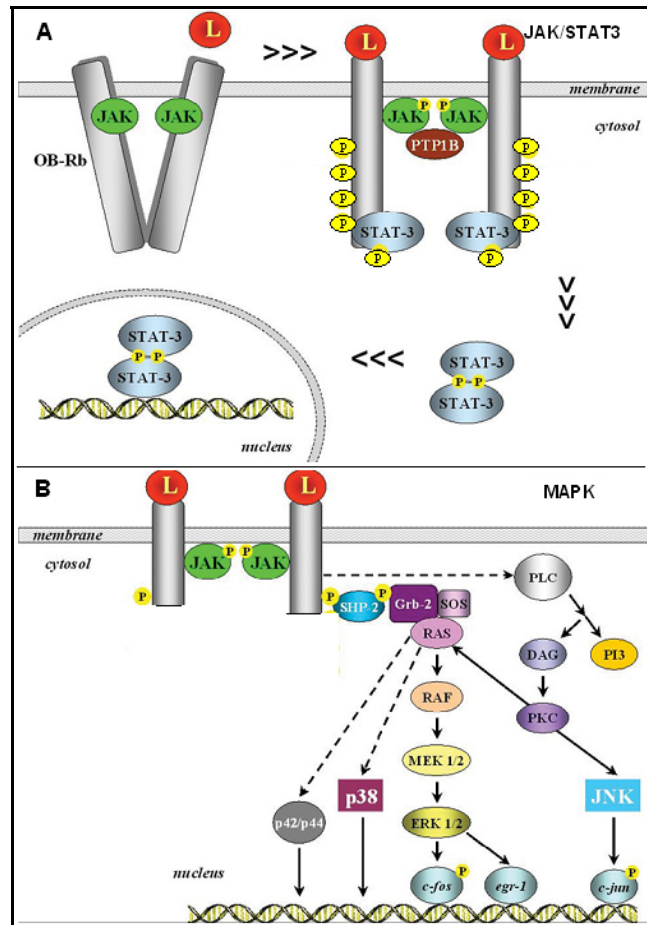


Imagen 2.12. Representación esquemática de la vías intracelulares de A) las JAK/ STAT3 y de B) las MAPK, activadas por la unión de la leptina (L) con su receptor (Ob-R) de membrana. Adaptado de Fruhbeck, 2006.

A su vez, las interacciones entre la leptina y los complejos cúmulo-oocito pueden dar lugar a cambios en el patrón esteroidogénico de los mismos y, por lo tanto, afectar indirectamente al proceso de maduración de los oocitos, como se ha referido anteriormente en esta Memoria. Aunque existen diferencias importantes entre especies respecto al mecanismo a través del cuál la leptina estaría influyendo sobre el oocito (Duggal *et al.*, 2002).

La leptina parece estar implicada en la regulación de la esteroidogénesis de las células de la granulosa, mediada por diferentes factores como: el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGFI) y las proteínas de unión al IGFI (IGF/IGFBP, *Insulin Growth Factor/ Insulin Growth factor Binding Proteins*) (Sirotkin *et al.*, 2005); el factor de crecimiento tisular (TGF, *Tissue Growth Factor*) (Zachow *et al.*, 1999); la insulina (Spicer y Francisco, 1997) o el óxido nítrico (NO; *Nitric Oxide*) (Huang *et al.*, 2005), entre otros. En este sentido, Catalano *et al.* (2003), determinaron que, en la especie humana, la leptina estimulaba la producción de estradiol en las células de la granulosa luteinizadas a través de un aumento de la

actividad aromatasa. Sin embargo, en presencia de la FSH, las concentraciones elevadas de leptina suprimen la síntesis de estradiol *in vitro* sin alterar la secreción de progesterona en las células de la granulosa (mujer: Agarwal *et al.*, 1999; Tsai *et al.*, 2002; rata: Zachow y Magoffin, 1997; Duggal *et al.*, 2002; cerda: Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2005). De esta forma, los niveles óptimos de leptina podrían contribuir al establecimiento de un ambiente folicular apropiado para la maduración correcta del oocito durante el periodo preovulatorio (Karamouti *et al.*, 2003). No obstante, existen hallazgos contradictorios respecto a la influencia de la leptina sobre la esteroidogénesis dependiendo de la especie, del medio de cultivo utilizado y de las condiciones experimentales (vaca: Spicer y Francisco, 1997; rata: Barkan *et al.*, 1999; mujer: Brannian *et al.*, 1999, Catalano *et al.*, 2003). Los estudios realizados en cultivos de células de la granulosa aislados, no tienen en cuenta los factores autocrinos y paracrinos que secretan los complejos cúmulo- oocito en conjunto y que pueden afectar a la maduración en respuesta a diferentes concentraciones de leptina. Por lo tanto, hay que tener precaución al comparar e interpretar estos resultados entre sí.

Así pues, el efecto de la leptina sobre la maduración, los mecanismos de acción intracelulares y la respuesta esteroidogénica inducida en los COC no están clarificados, no existiendo en lagomorfos ningún estudio al respecto.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DISEÑOS EXPERIMENTALES

3.1.1. Estudio de estrategias de manejo reproductivo

3.1.1.a. Métodos de sincronización de estro

En el Experimento 1a, las conejas primíparas lactantes fueron sometidas antes de la IA que tuvo lugar el día 11 post-parto, a diferentes tratamientos de sincronización de estro. Un grupo recibió un tratamiento hormonal estándar extensamente utilizado en granjas cunícolas, para estimular el desarrollo folicular (Grupo eCG). Para ello, a las conejas se les aplicó 25 UI de eCG (Serigan®, Laboratorios Ovejero, León, España) intramuscular 48 horas antes de la IA. En el segundo grupo se utilizó un método no hormonal alternativo, basado en la bioestimulación de las conejas, descrito previamente por Alvariño *et al.* (1998) (Grupo Bio). Para ello, las hembras lactantes permanecieron sin acceso al nido durante 24 horas previas al momento de la IA.

Se midieron los niveles de estradiol y progesterona séricos, se categorizó la población folicular, se determinó la tasa de atresia folicular, el grado de maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos y la capacidad esteroidogénica de los complejos cúmulo-oocito durante su maduración *in vitro*.

3.1.1.b. Ritmos reproductivos

En el Experimento 1b se estudió el día post-parto más apropiado para realizar la IA en conejas primíparas, de acuerdo a dos ritmos reproductivos que pueden ser utilizados en cunicultura. La mitad de las hembras se inseminaron el día 11 post-parto, siguiendo un ritmo semi-intensivo de producción (Grupo S), que es el más utilizado en las granjas cunícolas europeas. La otra mitad de las hembras fueron inseminadas el día 32 post-parto siguiendo un ritmo de producción más extensificado (Grupo E).

Se determinó la composición corporal, el estatus metabólico mediante parámetros séricos (proteínas totales, NEFA, leptina), los niveles de prolactina séricos y la fisiología ovárica (peso de los ovarios, niveles de estradiol y progesterona séricos, categorización de la población folicular, tasa de atresia folicular, inmunolocalización del receptor de la prolactina, grado de maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos madurados *in vitro*) de las conejas después del primer parto.

3.1.2. Estudio de estrategias de manejo nutricional

Para realizar los Experimentos 2a y 2b, se constituyeron dos grupos de animales al azar durante el periodo de recría, que se alimentaron con piensos fibrosos, suministrados *ad libitum* y formulados con un elevado porcentaje de fibra neutro detergente desde las 11 semanas de edad hasta su primer parto. La composición química y los ingredientes de dichos piensos se detallan en las Tablas 3.1 y 3.2, respectivamente.

Tabla 3.1. *Composición química (% MS) de los piensos experimentales fibrosos con un contenido estándar (pienso SL) o elevado (pienso HL) de lignina ácido detergente.*

	SL	HL
Materia seca	90,6	90,5
Cenizas	8,24	8,6
Energía Bruta (kcal/ g)	4357	4415
Energía Bruta (MJ/ g)	18,2	18,5
Proteína Bruta	16,8	16,6
Extracto Etéreo	3,15	3,32
Fibra Neutro Detergente	40,9	49,6
Fibra Acido Detergente	20,3	33,9
Lignina Acido Detergente	4,9	15,8
Almidón	17,9	8,9
Azúcares	3,95	3,06
Fibra Soluble	9,01	9,88
Composición vitamínico y mineral:		
⁽¹⁾ Cu, 8,0 mg/Kg; α-tocoferol, 35 mg/Kg; vitamina A, 10000 UI/Kg; vitamina D3, 900 UI/Kg		
⁽²⁾ Cu, 9,6 mg/Kg; α-tocoferol, 42 mg/Kg; vitamina A, 12000 UI/Kg; vitamina D3, 1080 UI/Kg		

Tabla 3.2. *Composición de ingredientes (%) de los piensos experimentales fibrosos con un contenido estándar (pienso SL) o elevado (pienso HL) de lignina ácido detergente.*

	SL	HL
Alfalfa-16/17 P	28,00	50,00
Granilla de uva desengrasada	0,00	19,00
Trigo	10,00	10,00
Salvado de trigo	12,50	12,50
Pulpa de remolacha	14,00	0,00
Paja tratada	22,00	0,00
Girasol-30%	7,40	7,40
Soja 44%	5,00	0,00
Lisina-L	0,06	0,06
Treonina-L	0,07	0,07
Carbonato de calcio fino	0,32	0,32
Sal de mina	0,50	0,50
Bacitracina de cinc	0,20	0,20
Corrector	⁽²⁾ 0,24	⁽²⁾ 0,24

La dieta con un contenido estándar de lignina (Dieta SL: *Standard Lignin*), contenía un 40,9% de FND y un 4,9% de lignina ácido detergente (LAD) sobre MS. Se trataba de una dieta compuesta principalmente por alfalfa, pulpa de remolacha y paja tratada. La dieta experimental alternativa con un alto contenido de lignina (Dieta HL: *High Lignin*), contenía un 49,6% de FND y un 15,8% de LAD sobre MS. Esta dieta estaba elaborada fundamentalmente con alfalfa y granilla desengrasada de uva. Después del parto las conejas primíparas lactantes comieron un pienso comercial estándar formulado para conejas lactantes y gazapos (Cunimax A®, Cargill, SA, Zaragoza, España) *ad libitum*.

Los parámetros que se determinaron fueron el consumo de pienso, el peso de las conejas, la composición corporal, el estatus metabólico, la fisiología ovárica (peso de los ovarios, niveles séricos de estradiol y progesterona, categorización de la población folicular, tasa de atresia folicular, tasa de ovulación y grado maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos *in vitro*), así como el desarrollo embrionario (tasa de embriones obtenidos y desarrollo embrionario en cultivo *in vitro*).

3.1.3 Estudio de la influencia de la leptina sobre la maduración de oocitos

En el Experimento 3, primeramente, se añadieron diferentes concentraciones de leptina (0, 1, 10 ó 100 ng/ mL) al medio de maduración para valorar la influencia de esta hormona sobre el grado de maduración nuclear y citoplásmica *in vitro* de los oocitos y su respuesta esteroidogénica.

A continuación, para el estudio de la implicación de dos de las posibles rutas de acción de la leptina durante la maduración de los oocitos se incluyeron en el medio de maduración diferentes concentraciones de inhibidores de la vía de las MAPK (PD098059®, Cell Signalling technology Inc., Denvers, MA, USA) en un grupo de experimentos y de las JAK/STAT3 (AG490®) en otro grupo de experimentos y se valoró, igualmente, el grado de maduración *in vitro* de los oocitos y su respuesta esteroidogénica. Los grupos experimentales fueron los descritos en la siguiente tabla:

Tabla 3.3. Grupos experimentales diseñados para estudiar el efecto de la leptina a través de la activación de las MAPK y las STAT3, mediante la adición al medio de inhibidores de ambas vías de señalización (PD098059 y AG490, respectivamente).

	-	10 μ M PD098059	50 μ M PD098059	10 μ M AG490	100 μ M AG490
0 ng/mL leptina	0 Lep	M-0/10	M-0/50	S-0/10	S-0/100
10 ng/mL leptina	10 Lep	M-10/10	M-10/50	S-10/10	S-10/100

3.2. ANIMALES Y ALOJAMIENTO

Los animales utilizados en los diferentes protocolos experimentales fueron conejas (*Oryctolagus cuniculus*), híbridos de Neozelandés blanco x California. Una vez adquiridos de una granja multiplicadora, se alojaron en la granja experimental del Departamento de Producción Animal de la Universidad Politécnica de Madrid (UPM), que consta de una nave de maternidad y una de cebo. Las conejas fueron colocadas en jaulas individuales y

dispusieron de agua *ad libitum* y un comedero tipo tolva para suministrarles el pienso. Los nidales eran de hierro galvanizado con el suelo “tipo sándwich” con una compuerta superior abatible que servía para impedir el acceso de la coneja al nido (Imagen 3.1). Los nidos se prepararon dos días antes del parto empleando paja desinfectada con azufre. Los animales se mantuvieron bajo las siguientes condiciones ambientales: ventilación (15 renovaciones/hora), temperatura (19-22°C) y humedad (50 ± 5%); el fotoperiodo durante todos los experimentos fue constante con 16 horas de luz/8 horas de oscuridad.



Imagen 3.1. A) Nave de maternidad de la granja experimental de la UPM (las flechas blancas señalan las jaulas con los nidos). B) Detalle del acceso a los nidos (flechas blancas) y al comedero (flecha negra) en el interior de las jaulas. C) Madre con sus gazapos en una jaula individual.

El diagnóstico de gestación se realizó por palpación abdominal el día 12 post-inseminación. Las conejas que no quedaron gestantes tras la primera inseminación artificial (IA) fueron desechadas de los experimentos. El control de los nidos se realizó el día del parto. Sólo se utilizaron aquellas hembras gestantes que en su primer parto tuvieron como mínimo una camada de 8 gazapos, ahijando aquellos de las hembras pertenecientes al mismo tratamiento o grupo experimental con camadas superiores, para obtener un número similar de gazapos para cada madre (entre 8 y 10). Los gazapos se destetaron a los 28 días post-parto. La fertilidad se calculó de acuerdo al número de gestaciones a término con respecto al número de IA realizadas. El cálculo de la prolificidad y la mortinatalidad, es decir, el número de nacidos vivos y muertos por parto, se realizó en el momento del mismo.

Todos los protocolos experimentales fueron previamente sometidos a la aprobación del Comité de Ética del Departamento de Producción Animal, siendo autorizados el 31 de octubre de 2006. Los animales que se emplearon para los estudios de la composición corporal, endocrinos, metabólicos, ováricos y embrionarios fueron escogidos al azar de los diferentes grupos experimentales de manejo reproductivo y nutricional (Experimentos 1a, 1b, 2a y 2b). La eutanasia, en su caso, se realizó con una sobredosis de pentobarbital sódico (30 mg/ Kg; Dolethal®, Vetoquinol, Zaragoza, España) administrado por vía endovenosa en la vena marginal de la oreja.

Por otro lado, para el estudio de la influencia de la leptina sobre la maduración de los oocitos *in vitro*, se utilizaron ovarios de conejas adultas procedentes del matadero (Jumogar, SL, Tarancón, España y Bozano, SL, Torrijos, España).

A menos que se describa de otra forma, todos los reactivos utilizados en los procedimientos descritos a continuación procedieron de Sigma (Sigma- Aldrich, SL, San Luis, MO, USA).

3.3. TÉCNICAS Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.3.1. Análisis químico de los piensos y determinación de la energía digestible

Los análisis químicos de los piensos y las heces se realizaron de acuerdo con la AOAC internacional (*Association of Official Analytical Chemists International*, 2000): materia seca (934.01), proteína bruta (método Dumas, N x 6,25), cenizas (942.05) y extracto etéreo (RD 609/1999 nº 4, previa hidrólisis ácida). Para medir la energía bruta (EB), se utilizó una bomba calorimétrica adiabática. El contenido en fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) y lignina ácido detergente (LAD), se determinaron secuencialmente utilizando el sistema “filter bag” (Ankom Technology®, Nueva York, USA) de acuerdo con Van Soest *et al.* (1991) y Mertens (2002). Los azúcares se estimaron según las tablas de la Fundación Española De Nutrición Animal (FEDNA, 2003). La fibra soluble se calculó por diferencia a 100 de la suma del resto de los nutrientes.

Para determinar la energía digestible (ED) de los piensos se realizó una prueba de digestibilidad fecal de acuerdo con Pérez *et al.* (1995). Para ello, se utilizaron 8 animales de 15 semanas de edad por pienso experimental y con un peso medio de $2,8 \pm 0,2$ kg en los cuales, las heces duras fueron recolectadas durante 4 días consecutivos y se congelaron a -20°C hasta su análisis. Tras ser descongeladas a temperatura ambiente, las heces se desecaron en la estufa a 65°C durante 2 días y se trituraron en un molinillo centrífugo para su posterior análisis químico.

3.3.2. Inseminación artificial

La inseminación se realizó con una mezcla heterospérmica de semen fresco obtenido con vagina artificial de los conejos reproductores que se encontraban en la misma granja experimental de la UPM. A continuación, se analizó la calidad del semen, y sólo se utilizaron

eyaculados que presentaban las siguientes características de acuerdo con lo descrito por Rebollar (1993) (Imagen 3.2):

❖ **Macroscópicas:** La consistencia (densa), el volumen (0,3-1mL), el color (blanco nacarado) y el pH (6,8-7,5).

❖ **Microscópicas:** La motilidad masal (60-70% del total de espermatozoides de la muestra) e individual (50% sobre el total de los espermatozoides móviles), la concentración (500-800 millones espermatozoides/mL) y las formas anormales (menos del 12-25%).

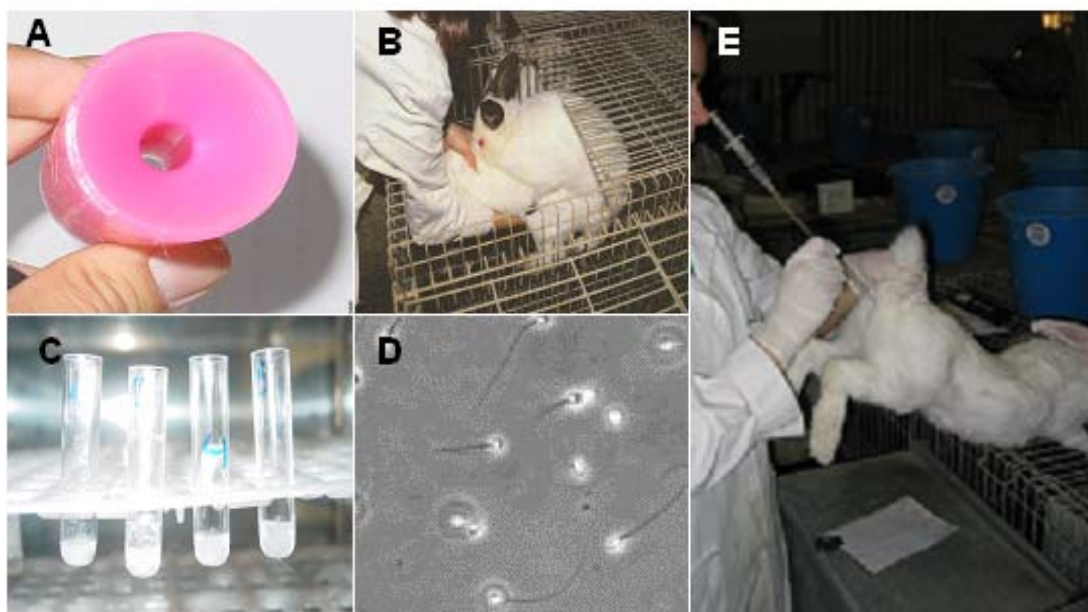


Imagen 3.2. Procedimiento de extracción de semen e inseminación artificial: A) Vagina artificial. B) Extracción del semen. C) Imagen macroscópica de diferentes eyaculados. D) Imagen microscópica de la mezcla heterospermica seminal. E) Deposición de la dosis seminal mediante IA en la coneja.

Prevía eliminación de la fracción de gel del eyaculado, si existía, y tras su valoración, los eyaculados elegidos se mezclaron con un diluyente comercial para semen de conejo (Cudil®, Magapor, SL, Zaragoza, España), de modo que la mezcla heterospermica contuviera una concentración aproximada de 20 millones de espermatozoides en dosis de 0,5 mL. Para inducir la ovulación se empleó 1 µg de buserelina diluida en 0,5 mL de suero glucosalino (Suprafact®, Hoechst Marion Roussel, SA, Madrid, España) aplicada por vía intramuscular, inmediatamente después de la IA. El semen se depositó en la zona craneal de la vagina mediante cánulas de vidrio estériles curvadas en su extremo y acopladas a una jeringa dosificadora.

3.3.3. Bioimpedancia eléctrica

Para estimar la composición corporal de los animales se utilizó el método del análisis de bioimpedancia eléctrica (BIA). Esta técnica está basada en la reducción de voltaje que experimenta una corriente eléctrica al pasar a través de un objeto. Esta reducción depende de la configuración geométrica del objeto y de la intensidad y frecuencia de la señal. Asumiendo que los animales tienen una configuración geométrica constante y utilizando una señal eléctrica también constante, las diferencias en impedancia dependen de la composición corporal del animal. Así, la grasa ofrece valores más altos de impedancia que el magro (Lukaski *et al.*, 1985).

La resistencia y la reactancia se midieron con la ayuda de 4 agujas introducidas a través de la piel y conectadas a 4 electrodos del aparato Quantum II (Model BIA-101®, RJL Systems, Detroit, MI, USA (Imagen 3.3). Posteriormente se calculó la impedancia que mide el freno que sufre la corriente eléctrica cuando pasa a través del cuerpo del animal: $\text{Impedancia} = (\text{resistencia}^2 + \text{reactancia}^2)^{1/2}$

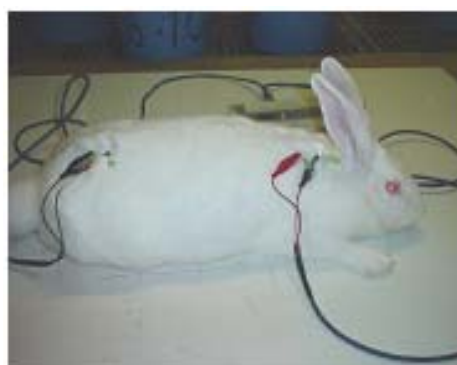


Imagen 3.3. Electrodo colocados en la coneja para la medición de la bioimpedancia eléctrica.

Se aplicaron las ecuaciones de predicción validadas por Pereda *et al.* (2007) para determinar la composición corporal de la coneja en cuanto a contenido en humedad, proteína, grasa, cenizas, energía bruta y extracto etéreo, teniendo en cuenta el resultado de la BIA, el peso, el número de parto y el estado de fisiológico de la coneja.

3.3.4. Análisis de parámetros séricos metabólicos y hormonales

Una vez inmovilizados los animales en cepos adecuados a su tamaño, las muestras sanguíneas se obtuvieron de la arteria central de la oreja, en todos los experimentos, a la misma hora de la mañana para evitar variaciones circadianas. Una vez recogidas las muestras en viales sin anticoagulantes, se centrifugaron inmediatamente a 2000 g durante 10 minutos a 4°C para extraer el suero y se almacenaron congeladas a – 32°C hasta el momento de su análisis.

3.3.4.a. Ácidos grasos no esterificados (NEFA)

Para la determinación de los NEFA se utilizó el kit comercial NEFA C de Wako (Wako Pure Chemical Industries®, Ltd. Osaka, Japón). Se trata de un test colorimétrico enzimático para la determinación cuantitativa *in vitro* de los ácidos grasos libres en suero y plasma sanguíneos. La prueba está basada en tres reacciones catalizadas cada una por un enzima específico (*Acil-CoA-sintetasa*, *Acil-CoA-oxidasa*, *peroxidasa*).



Imagen 3.4. *Aspecto de la coloración de las cubetas con las muestras para el análisis de la absorbancia.*

Todas la muestras se midieron por duplicado en un mismo ensayo. La concentraciones de NEFA se analizaron en un espectrofotómetro (Hitachi, Modelo nº 556, Tokio, Japón). La intensidad del pigmento rojo-púrpura observada a una longitud de onda de 550 nm es proporcional a la concentración de ácidos grasos libres de la muestra.

El método es lineal dentro un rango de 0,0 a 2,0 mM/ L. El coeficiente de variación intra e Interensayo de concentraciones conocidas de NEFA fue inferior al 2,7%.

3.3.4.b. Proteínas totales

La determinación de proteínas totales séricas se llevó a cabo por un método químico cuantitativo: el método Biuret, de acuerdo a Tietz, (1995). El principio activo de esta técnica es la actuación recíproca de iones cúpricos en un medio alcalino con los péptidos que constituyen los componentes proteicos, formándose un producto coloreado. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro (Hitachi, Modelo nº 556), midiéndose la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. El método es lineal hasta un rango de 13 g/ dL.

3.3.4.c. Leptina

La determinación cuantitativa de la leptina en suero se realizó en muestras duplicadas mediante radioinmunoanálisis (RIA) de competición, utilizando un kit comercial (Multi-species Leptin RIA®, Linco Research, San Carlos, MO, USA). La técnica está basada en la reacción de competición entre dos antígenos: la leptina presente en el suero sanguíneo (solución problema) y la leptina añadida en una cantidad constante marcada con un isótopo radioactivo, I^{125} (solución estándar). Ambas compiten por unirse con el anticuerpo específico

(anti-leptina) agregado en cantidad limitada. Tras la reacción de competición, se separan las fases ligadas y no ligadas por precipitación inmunológica. Se utiliza un segundo anticuerpo que se une al complejo antígeno-anticuerpo dando lugar a otro complejo de gran tamaño, insoluble y de fácil precipitación. Finalmente se lee la fase ligada en un contador gamma (Wallac Wizard 1490 Automatic Gamma Counter, Wallac Oy, 20101, Turku, Finlandia). El anticuerpo del kit actúa frente a la leptina humana, presentando reacciones cruzadas con la molécula de leptina de otras especies. En la coneja, este kit ya ha sido previamente utilizado por otros autores (Corino *et al.*, 2002; Depoortere *et al.*, 2004; Brecchia *et al.*, 2006). Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron del $3,1 \pm 0,2\%$ y del $7,3 \pm 0,5\%$, respectivamente. El límite de detección fue de $0,1 \text{ ng/ mL HE}$ (*Human Equivalent*) tras ajustar la curva estándar para los valores a obtener en la coneja.

3.3.4.d. Prolactina (PRL)

La determinación cuantitativa de la PRL en suero se midió en muestras duplicadas mediante enzoinmunoanálisis (ELISA) tipo “sándwich”, utilizando un kit comercial (Rabbit prolactin, PRL ELISA kit®, USCN LIEF, Missouri, USA). En el ELISA tipo sándwich, los pocillos están recubiertos con un primer anticuerpo anti-antígeno (anti-PRL). Se aplica la muestra de suero con niveles desconocidos de PRL (antígeno problema), que se une específicamente con el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado se añade un segundo anticuerpo anti-PRL marcado con un enzima (peroxidasa de rábano ó HRP). Así pues, cada molécula de PRL está unida a un anticuerpo que recubre el pocillo y un segundo anticuerpo que la marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. El anticuerpo del kit utilizado reconoce específicamente tanto la PRL recombinante como la PRL natural de conejo, no presentando reacciones cruzadas o interferencias significativas. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron del $7,7\%$ y del $8,4\%$, respectivamente. El límite mínimo de detección fue de $0,39 \text{ ng/ mL}$, definido como la concentración mínima de proteína que se diferencia de cero.

3.3.4.e. Estradiol (E_2) y Progesterona (P_4)

Las concentraciones de E_2 y P_4 séricas fueron determinadas por duplicado mediante inmunoensayos magnéticos quimioluminiscentes competitivos en fase sólida (CMIA, Abbott laboratories®, Abbott Park II, North Chicago, Illinois, USA). El método de quimioluminiscencia consiste en la emisión de luz a través de una reacción química que incluye la oxidación de un compuesto orgánico por medio de un oxidante. En los formatos competitivos, el estradiol o la progesterona del suero sanguíneo (antígeno problema) se

miden por su capacidad para competir con un antígeno marcado con un derivado de la acridina patentado en el inmunoensayo (antígeno estándar). El antígeno problema sin marcar bloquea la capacidad del antígeno estándar marcado para unirse, puesto que ese punto de unión con el anticuerpo específico ya se encuentra ocupado. Para la detección del E₂ se utilizaron anticuerpos monoclonales de conejo anti-estradiol. Para la detección de la P₄ se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo anti-progesterona. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron del 6,6% y 7,0% para el E₂; 5,8% y 6,3% para la P₄, respectivamente. El límite de detección fue de 10 pg/ mL (E₂) y de 0,2 ng/ mL (P₄).

3.3.5. Estudio macroscópico del ovario y de la población folicular ovárica

3.3.5.a. Obtención de los ovarios y descripción macroscópica

Los ovarios se obtuvieron mediante laparotomía media ventral después de la eutanasia. A continuación, se llevó a cabo un estudio macroscópico en el cuál éstos se pesaron y se realizó el recuento de los folículos antrales mayores de 1 mm de diámetro y de los cuerpos lúteos post-ovulatorios presentes en la superficie, según el tipo de experimento y el momento de la recogida de los ovarios respecto al día de la inseminación (Imagen 3.5).



Imagen 3.5. Aspecto macroscópico de los ovarios de la coneja. FA \geq 1 mm: folículos antrales mayores de 1 mm de diámetro. FH: folículos hemorrágicos. CL: cuerpos lúteos.

3.3.5.b. Estudios histológicos, de atresia folicular e inmunohistoquímicos

Para llevar a cabo estos estudios, los ovarios se cortaron longitudinalmente y se fijaron con paraformaldehído diluido al 4% en tampón fosfato (PBS, *Phosphate-Buffered Saline*, pH 7,4) durante 12 horas. A continuación se lavaron en PBS durante 30 minutos y se almacenaron en etanol diluido al 70% en agua destilada hasta ser incluidos en bloques de parafina. Se realizaron cortes seriados cada 5 μ m con un microtomo para efectuar los estudios

morfométricos en cada uno de los ovarios recogidos de cada animal (Servicio de Histología del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), CSIC, Madrid, España).

1) Categorización folicular

Las categorías foliculares fueron estudiadas en cortes de hematoxilina-eosina en el microscopio de campo claro (Olympus BX40®, Hamburgo, Alemania). Los folículos se clasificaron como primordiales (un oocito rodeado por una capa de células planas de la granulosa), primarios (un oocito rodeado de una capa de células cúbicas de la granulosa), secundarios (un oocito rodeado de dos o más capas de células de la granulosa) y antrales (folículos que presentan antro folicular en su interior).

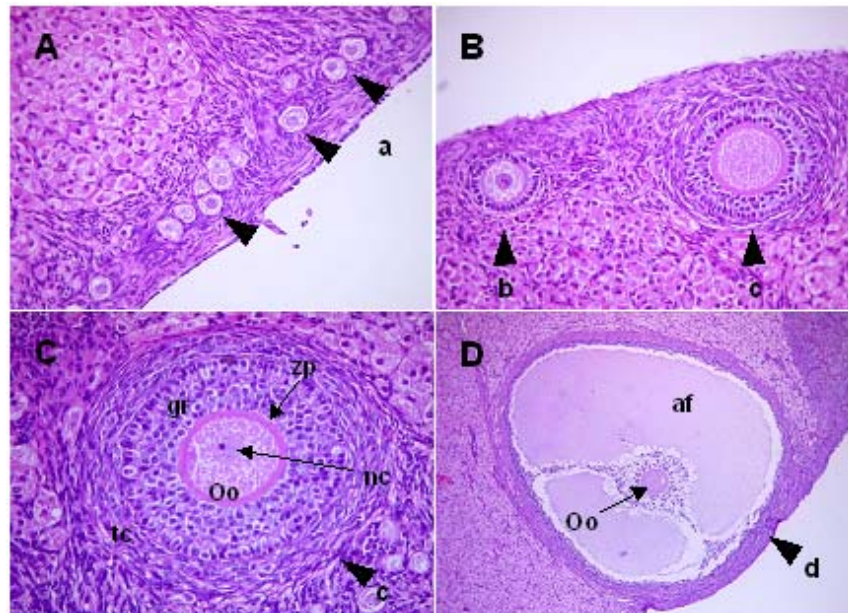


Imagen 3.6. Categorías foliculares en cortes histológicos de ovario de coneja teñidos con hematoxilina-eosina. A.a) Folículos primordiales (40x). B) b) folículo primario y, c) folículo secundario. (40x). C) Detalle de un folículo secundario (40x); Oo: oocito, nc: núcleo del oocito, zp: zona pelúcida, gr: células de la granulosa, tc: células de la teca. D) d) Folículo antral preovulatorio o de Graff (10x); Oo: oocito, af: antro folicular.

2) Detección In Situ de la apoptosis folicular

En la muerte celular programada o apoptosis, los núcleos de las células de la granulosa y por lo tanto el ADN se fragmentan. Uno de los métodos mas adecuados para identificar células en apoptosis es el marcaje *in situ* del ADN fragmentado o técnica de TUNEL (TdT mediated dUTP nick-end-labelling), desarrollada por Gavrieli *et al.* (1992). El fundamento de esta técnica se basa en la detección de la rotura del ADN internucleosomal. Con el TUNEL

se ponen de manifiesto la presencia de los extremos 3'-OH libres que se generan en la fragmentación del ADN, ya que dichos extremos incorporan nucleótidos marcados (dUTPs) mediante la acción del enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT, *Terminal Deoxynucleotidyl Transferasa*). Las células de los folículos positivos al TUNEL se visualizan de color verde mientras que las negativas no presentan fluorescencia.

El procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio para la detección de la apoptosis folicular en el ovario de la coneja es el siguiente: después de la desparafinación con xileno (mediante 5 pases de 4 minutos en cada uno) y de la rehidratación con concentraciones decrecientes de alcoholes diluidos en agua destilada (100°, 96° y 70°), durante 4 minutos en cada uno de ellos, las secciones se desnaturalizaron con 20 µg/ mL de proteinasa K en tampón TBS (TBS, *Tris Buffer Solution*, 10 mM, pH 7,5) en cámara húmeda a 37°C y en oscuridad durante 30 minutos. A continuación, las secciones fueron incubadas con la mezcla de TUNEL (TUNEL; *In Situ Cell Death Detection Kit*, POD®, Roche Diagnostics, SL, Applied Science, Mannheim, Alemania) compuesta por una solución enzimática (TdT) y la solución de marcaje (dUTPs), en cámara húmeda a 37°C y en oscuridad durante 1 hora. Entre cada paso del procedimiento las secciones se lavaron tres veces en PBS. Finalmente, los portaeslides se montaron y se contrastaron con medio de montaje con 4', 6-diamino-2-phenylindole (Vectashield mounting medium with DAPI®, Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, UK).

Los controles positivos fueron tratados con ADNasa recombinante (Roche Diagnostics, SL, Applied Science, Mannheim, Alemania) diluida en medio de reacción (TBS, 50 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 7,5) en cámara húmeda, a temperatura ambiente, durante 10 minutos, previo a la incubación con la mezcla de TUNEL. Los controles negativos, fueron incubados solamente con la solución de marcaje de las células de la mezcla del TUNEL (dUTPs) sin añadir la solución enzimática. Las muestras se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Leica F550®, Wetzlar, Alemania). Las células de los folículos positivos al TUNEL se visualizaron de color verde mientras que las negativas no presentaron fluorescencia. Los folículos con un estado de atresia medio o avanzado fueron examinados de acuerdo con Kasuya (1995) y el porcentaje de atresia folicular se expresó como el número de folículos positivos al TUNEL dividido por el número de folículos contabilizados, sin tener en cuenta los folículos primordiales.

3) Inmunolocalización del receptor de la prolactina (PRL-R)

El protocolo usado es el descrito por nuestro grupo anteriormente (García-García *et al.*, 2007). Primeramente, se desparafinaron los cortes con xileno (mediante 5 pases de 4 minutos en cada uno) y se rehidrataron con concentraciones decrecientes de alcoholes

diluidos en agua destilada (100°, 96° y 70°), durante 4 minutos en cada uno. A continuación, se realizó un tratamiento de las secciones con calor en tampón citrato 10 mM (pH 6) para desenmascarar los antígenos. Las muestras se incubaron con suero de bloqueo equino a una concentración de 1:30 en TBS durante 30 minutos y se suprimió la actividad de la peroxidasa endógena mediante la incubación de los portas con peróxido de hidrógeno diluido al 1,5% en metanol durante 15 minutos a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario se realizó a una concentración de 1:75 en TBS, a 4°C, durante toda la noche. El anticuerpo primario utilizado reconoce específicamente el PRL-R de conejo (Prolactin Receptor®, Affinity Bioreagents, Golden, USA).

En los controles negativos, se sustituyó la incubación con el anticuerpo primario por TBS. Después, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado a una concentración de 1:400 en TBS (Biotinylated anti- mouse IgG (H+L) made in horse®, Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, UK), a temperatura ambiente durante 30 minutos. Seguidamente, se trataron con el conjugado streptavidina-peroxidasa del rábano (HRP Streptavidin- conjugate 3, 3'-diaminobenzidina, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, California, USA) durante 30 minutos y con el sustrato con 3, 3'-diaminobenzidina (DAB, 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride®), durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron de nuevo con alcoholes a concentraciones crecientes (96° y 100°), durante 1 minuto en cada uno de ellos, y se trataron con xileno, mediante 4 pases de 1 minuto en cada uno. Entre cada paso, las secciones se lavaron en TBS dos veces, excepto después de la incubación con el suero de bloqueo; toda la técnica se realizó en condiciones de humedad en una cámara húmeda (Humid chamber, Stirene tray with lid®). Las secciones fueron analizadas al microscopio óptico (Olympus BX40®, Hamburgo, Alemania) por un único observador y fotografiadas con los mismos valores de intensidad y contraste. Para comparar la inmunodetección del PRL-R en los folículos antrales, se utilizó un programa de análisis de imagen, específico para este fin (Metamorph Imaging system 7.5®, Universal Image Corp., West Chester, USA). El programa cuantificó de manera objetiva el área del folículo marcada con PRL-R. Se establecieron tres umbrales de marcaje: un umbral de marcaje negativo (área del folículo no marcada, por lo tanto sin presencia de PRL-R) y dos niveles de marcaje positivo en función de la intensidad cromática: moderada o alta.

4) Inmunolocalización del receptor de la leptina (Ob-R)

Para la detección del Ob-R, se utilizó una modificación del protocolo descrito por Zerani *et al.* (2004) de modo que, tras el proceso de desparafinado y rehidratación (similar al descrito para el PRL-R), se realizó un tratamiento de calor en tampón citrato 10 mM (pH 6) para desenmascarar los antígenos. Seguidamente, se suprimió la actividad de la peroxidasa

endógena mediante la incubación de las preparaciones con peróxido de hidrógeno diluido al 0,3% en metanol durante 30 minutos. A continuación, todos los procedimientos se realizaron en cámara húmeda, a temperatura ambiente; entre cada paso, las secciones se lavaron en PBS dos veces, excepto entre la incubación con el suero de bloqueo y con el anticuerpo primario. Primeramente, las muestras se incubaron con suero de bloqueo de cabra (Normal goat serum®, Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, UK) a una concentración 1:10 en PBS durante 30 minutos. Seguidamente, las secciones se mantuvieron con el anticuerpo primario a una concentración de 1:50 en PBS durante toda la noche. El anticuerpo utilizado en este procedimiento (ObR antibody®, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) reconoce específicamente ambas isoformas del receptor de la leptina humana (isoforma corta y larga). En los controles negativos se sustituyó la incubación con el anticuerpo primario por PBS. Después, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario (Biotinylated anti-mouse IgG (H+L) made in goat®, Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, UK) a una concentración de 1:200 en PBS, durante 30 minutos, y seguidamente con el conjugado avidina-biotina (Avidin Biotin Complex, ABC Vector Elite kit®, Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, UK) durante 30 minutos. Posteriormente, se añadió el cromógeno (Vector Nova RED substrate Kit for Peroxidase®, Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, UK) durante 15 minutos, según las indicaciones del kit. Las muestras se contrastaron con hematoxilina, se deshidrataron de nuevo con alcoholes a concentraciones crecientes (96° y 100°), durante 1 minuto en cada uno, y se trataron con xileno, mediante 4 pases de 1 minuto en cada uno. Todas las secciones fueron analizadas al microscopio óptico (Olympus BX40®, Hamburgo, Alemania) por el mismo observador y fotografiadas con los mismos valores de intensidad y contraste para describir la inmunolocalización del Ob-R en las secciones ováricas.

3.3.6. Maduración *in vitro* de los oocitos de coneja

3.3.6.a. Recuperación de los Complejos Cúmulo-Oocito (COC) y protocolo de maduración *in vitro*

Los ovarios destinados al estudio de la maduración *in vitro* de los oocitos se obtuvieron de conejas procedentes de la granja experimental (Experimentos 1a, 1b, 2a y 2b), o bien de hembras adultas sacrificadas en el matadero (Experimento 3). Los ovarios de los animales procedentes de la granja experimental se obtuvieron mediante laparotomía media ventral después de su eutanasia (Imagen 3.7.A). En ambos casos, los ovarios fueron transportados al laboratorio en un termo con PBS a 37°C. Los oocitos se obtuvieron mediante la aspiración del contenido de los folículos antrales visibles en la superficie del ovario superiores a 1 mm

de diámetro (Jelinkova *et al.*, 1994) con una aguja de 25 G conectada a una jeringa de 2 mL utilizando un microscopio estereoscópico (Imagen 3.7.B y 3.7.C). Los COC recogidos se lavaron en placas Petri de 35mm (Nunc™ Surface®, Nunc™, Roskilde, Dinamarca) con PBS + 0,1% de albúmina sérica bovina (BSA, *Bovine Serum Albumine*, Fraction V, ≥ 96%®) a 37° C y fueron seleccionados para la maduración en base a criterios morfológicos de homogeneidad en el cúmulo y en el citoplasma, de acuerdo con lo descrito por Lorenzo *et al.* (1994; 1996a) (Imagen 3.7.D).

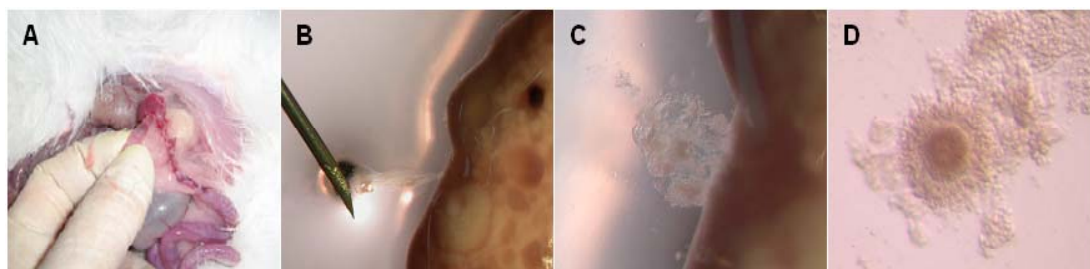


Imagen 3.7. Recuperación de los complejos cúmulo- oocito (COC). A) Exposición del ovario, oviducto y útero en una laparotomía media-ventral. B, C) Recuperación de los COC mediante aspiración folicular bajo microscopio estereoscópico. D) COC seleccionado para la maduración *in vitro*.

Se utilizaron para maduración una media de 30-40 COC dispuestos en placas de cuatro pocillos (Nunc™ Surface®, Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 500 µL de medio de maduración/ pocillo; la maduración se realizó durante 16 horas en un incubador (Nuair US Autoflow CO₂ Water-Jacketed Incubator®, Nuair™, USA) a 38°C con un 5% CO₂ en el aire y humedad máxima.

El medio de maduración base estaba constituido en todos los casos por medio de cultivo tisular (TCM-199, *Tissue Culture Medium*) (Medium 199®), 2 mM de L-Glutamina (L-Glutamine, cell culture tested, γ irradiated®), 0,1 mg/ mL de piruvato sódico (Sodium pyruvate®) y 100 UI/ mL de antibiótico/ antimicótico con penicilina-streptomycin-anfotericina B (Antibiotic antimicotic, lyophilized sterilized by γ- irradiation, cell culture tested®). El medio varió ligeramente según se describe a continuación en función de los diseños experimentales:

❖ Para la maduración *in vitro* de los oocitos de conejas de la granja experimental sometidas a diferentes tratamientos reproductivos y nutricionales (Experimentos 1a, 1b, 2a y 2b), el medio base estaba suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FCS, *Foetal Calf Serum*, cell culture tested®), 10 ng/ mL de factor de crecimiento epidérmico (EGF, *Epidermal Growth Factor*, tissue culture grade, from mouse submaxillary glands®) y 100 ng/ mL de factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I (IGF-I, *Insuline Growth Factor I*, human, recombinant expressed in *E.Coli*®).

❖ Por otro lado, se utilizaron ovarios de conejas adultas procedentes del matadero, para determinar el efecto de la leptina sobre el grado de maduración *in vitro* de los oocitos (Experimento 3). Para ello, el medio de maduración base estuvo suplementado con 0,3% de BSA y 0, 1, 10 ó 100 ng/ mL de leptina (Leptin, human recombinant expressed in *E.Coli*®) o con 10% de FCS. Para el estudio de la implicación de dos de las posibles rutas de acción de la leptina durante la maduración de los oocitos, el medio de maduración base estuvo suplementado con 0,3% de BSA y con 0 ó 10 ng/ mL de leptina. A su vez, a cada una de estas concentraciones de leptina se le añadió diferentes cantidades de inhibidores: 10 y 50 μ M de PD098059 ó 10 y 100 μ M de AG490, quedando los grupos ya descritos en el apartado 3.2.3. del material y métodos de esta Memoria.

3.3.6.b. Valoración del grado de maduración nuclear y citoplasmática del oocito

Después del periodo de maduración *in vitro* de los oocitos, se valoró el grado de maduración nuclear y citoplasmática alcanzado mediante el estudio confocal de la configuración nuclear y la distribución de la migración de los gránulos corticales (CG). Esta metodología presenta una serie de ventajas frente al microscopio electrónico, ya que permite una rápida detección de los gránulos corticales, también permite estudiar la célula en toda su integridad y existe la posibilidad de combinar esta tinción con otros fluorocromos que marcan selectivamente distintas regiones celulares (Reynaud et al., 2001).

Para ello, previamente, se puso a punto el procedimiento en oocitos de coneja a partir de estudios realizados en otras especies. Después del periodo de maduración *in vitro*, los oocitos fueron desnudados de su cúmulo celular con 2mM de hialuronidasa (Hyaluronidase from bovine testes®) y se trataron con pronasa al 0,5% en PBS (Protease type XIV, from *Streptomyces griseous*®) durante unos minutos para digerir la zona pelúcida. Posteriormente, se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7,4) durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Los oocitos se almacenaron a 4°C en PBS hasta su procesamiento. Seguidamente, en primer lugar se lavaron con una solución permeabilizante (Tritón X-100®) al 0,02% en PBS durante 15 minutos y se pasaron a una solución bloqueante con BSA al 7,5% en PBS durante 45 minutos. Para marcar los gránulos corticales se incubaron con 100 μ g/ mL de un conjugado de FITC (fluoresceína isotiocianato) y lectina (LCA: aglutinina de *Lens culinaris*) (Lectin from *lens culinaris*, FITC conjugate, lyophilized powder®) en una solución con PBS, a temperatura ambiente, durante una hora. Para valorar la configuración nuclear los oocitos, se lavaron a continuación con una solución permeabilizante (Tween 20®) al 0,002% en PBS durante 15 minutos y se

incubaron en 10 µg/ mL de propidio iodado (PI) (Propidium iodide ≥95% (HPLC)®) en PBS a 38°C durante 15 minutos. Finalmente, los oocitos se montaron en un portaobjetos, se cubrieron por un cubreobjetos sujeto con unas columnas de silicona, utilizando procedimientos anteriormente descritos por nuestro grupo (Lorenzo *et al*, 1994) y se guardaron en oscuridad a 4°C hasta su visualización. Los controles para el marcaje consistieron en el tratamiento de los oocitos sin utilizar Tritón X-100, ni FITC-LCA. Los oocitos se visualizaron con un sistema de imagen confocal (Leica, TCS SP5®, Wetzlar, Alemania). La maduración nuclear se valoró como porcentaje de oocitos que presentaron una configuración nuclear de metafase II. La maduración citoplasmática se valoró en función del grado de migración de los gránulos corticales como previamente se ha descrito en la revisión bibliográfica (distribución periférica, cortical, homogénea/ difusa y no homogénea (Imagen 2.8).

3.3.6.c. Producción esteroideogénica de los complejos cúmulo-oocito después de la maduración

Se analizaron los incrementos y las concentraciones de estradiol (E₂) y progesterona (P₄) presentes en el medio de cultivo tras la maduración *in vitro* de los oocitos en los Experimentos 1a y 3. El medio de cultivo en el tiempo cero y el procedente de los distintos grupos y tratamientos de maduración se recogió y se congeló a – 32°C hasta el momento de su procesamiento.

La determinación cuantitativa de los niveles de E₂ y P₄ en el medio de maduración se realizó en muestras duplicadas mediante enzimoimmunoanálisis (ELISA) con un kit comercial específico para el E₂ (Estradiol sensitive ELISA®, Demeditec diagnostics GMBH, Kile, Alemania) y para la P₄ (Progesterone ELISA®, Demeditec diagnostics GMBH, Kile, Alemania). El principio de acción de ambos kits es similar y consiste en un ensayo de inmunoabsorción en fase sólida unido a enzimas, basado en el principio de unión competitiva. Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo policlonal anti-estradiol o anti-progesterona, respectivamente. El estradiol o la progesterona del medio de maduración (antígenos problema) compiten con un conjugado antígeno-enzima (estradiol o progesterona estándar combinados con peroxidasa del rábano) en la unión al anticuerpo específico inmovilizado. El resto que queda libre en los pocillos, se elimina posteriormente mediante lavados. La cantidad de conjugado unido es inversamente proporcional a la concentración de estradiol o progesterona en la muestra. Por lo tanto, después de la adición del sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de estradiol/ progesterona en el medio de cultivo. La absorbancia de las muestras se analizó con un espectrofotómetro (Multiskan EX, Thermo Scientific: Waltham,

Massachussets, USA). El coeficiente de variación intraensayo e interensayo fue del 5,5% y 6,8% para el E₂ y del 5,4% y 9,9% para la P₄, respectivamente. El límite de detección fue < 1,399 pg/ mL para el E₂ y de 0,045 ng/ mL para la P₄. El rango del ensayo se encontraba entre 0-200 pg/ mL para el E₂ y 0-40 ng/ mL para la P₄.

3.3.7. Viabilidad embrionaria

3.3.7.a. Tasa de ovulación y recogida de los embriones

En los Experimentos 2a y 2b, la tasa de ovulación fue determinada mediante el recuento del número de cuerpos lúteos presentes en cada ovario. Los embriones se recuperaron mediante lavado del tracto reproductor 3,5 días después de la IA.

El lavado se realizó en sentido retrógrado, desde el cuerno uterino hasta el istmo oviductal con una aguja de 21 G conectada a una jeringa de 10 ml que contenía PBS suplementado con 0,1% de BSA a 37°C. El fluido de lavado introducido se recogía en tubos falcon de 15 ml.



Imagen 3.8. Lavado del tracto reproductor.

3.3.7.b. Valoración morfológica de los embriones

Los embriones recuperados fueron transferidos desde el tubo de recogida falcon hasta una placa Petri con PBS + 0,1% de BSA, donde se localizaron con un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ-800®, Tokio, Japón). Durante todo el procedimiento las placas eran mantenidas sobre una platina térmica (Minitub®, Tiefenbach, Alemania) a 37°C.

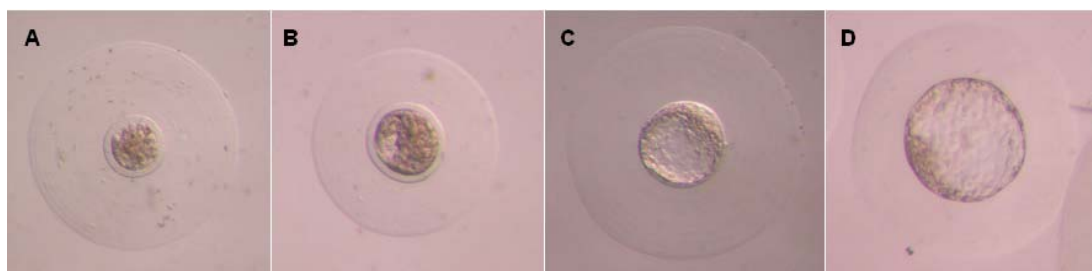


Imagen 3.9. Embriones de coneja en distintos estadios rodeados de la capa de mucina. A) Mórula. B) Mórula cavitada C) Blastocisto. D) Blastocisto expandido.

La clasificación de la viabilidad de los embriones en el momento de la recogida se realizó de acuerdo a criterios morfológicos según la descripción de Overstrom (1996); así, fueron clasificados en tres categorías: embrión viable, degenerado y retrasado (aquellos embriones cuyo estadio en el momento de la recuperación no era acorde con el tiempo transcurrido desde la ovulación, ej.: cigotos, embriones de 2-4, 5-8, 9-16 células y mórulas tempranas), incluyendo también los oocitos no fecundados. Los porcentajes de dichas categorías se dieron respecto al total de oocitos y embriones obtenidos tras el lavado del tracto reproductor. Sólo los embriones considerados como viables fueron cultivados *in vitro*.

3.3.7.c. Cultivo de embriones *in vitro*

Los embriones viables se cultivaron en placas de cuatro pocillos (Nuncclon™ Surface®, Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 500 µl de un medio basado en TCM-199 suplementado con 10% de FCS y 100 UI/ mL antibiótico/ antimicótico (penicilina- streptomycin- anfotericina B) durante 72 horas en un incubador a 38°C con un 5% CO₂ en el aire y humedad máxima para evaluar su capacidad de desarrollo *in vitro*. La viabilidad o capacidad de desarrollo de los embriones *in vitro* se valoró como la progresión de los mismos de un estadio embrionario al siguiente ya que los embriones de coneja son incapaces de romper la capa de mucina en condiciones *in vitro* (Kane, 1975; Denker y Gerdes, 1979). Los diferentes estadios embrionarios observados se definieron basándose en los criterios morfológicos convencionales establecidos por la sociedad internacional de transferencia de embriones (IETS), descritos en la revisión bibliográfica.

3.3.8. Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico se utilizaron los paquetes estadísticos SAS (Statistical Analysis Systems, SAS/ STAT User's Guide, Release 8.2, Inst. Inc, Cary NC, USA) y SPSS para windows (SPSS 13.0, Inc, Chicago, IL, USA).

3.3.8.a. Capítulos 1 y 2

Los efectos de los métodos de sincronización de estro (Experimento 1a) y del ritmo de cubrición sobre las conejas primíparas en el momento de la IA (Experimento 1b), así como de los tratamientos nutricionales sobre los parámetros estudiados en las conejas nulíparas y primíparas (Experimento 2a y 2b), se analizaron como un diseño completamente al azar con el método de sincronización de estro, el ritmo de cubrición y el tipo de pienso como las principales fuentes de variación respectivamente.

Análisis de las variables continuas (cuantitativas) sometidas a diferentes tratamientos experimentales a lo largo del tiempo

Para comparar el peso vivo, la composición corporal así como los parámetros séricos metabólicos (concentraciones de NEFA y proteínas totales) y endocrinos (concentraciones de leptina) de las conejas en varios puntos en el tiempo se realizó un análisis de medidas repetidas utilizando a la coneja como unidad experimental, mediante el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (Experimento 1b, 2a y 2b). Este procedimiento analiza las diferencias de cada animal a lo largo del periodo productivo estudiado, y entre animales. Los efectos fijos fueron los tratamientos (dietas o ritmos reproductivos), el tiempo, y sus interacciones.

Análisis de las variables continuas (cuantitativas) sometidas a diferentes tratamientos experimentales en un momento puntual y que siguen una distribución normal

Los valores medios de las hormonas esteroideas y de la prolactina en el suero, así como, del peso del ovario entre dos grupos experimentales se compararon mediante el test *t*-student para variables independientes del programa SPSS. La prolificidad (nacidos vivos y muertos por parto) y el consumo de pienso se analizaron mediante el procedimiento GLM del SAS, utilizando la coneja como unidad experimental en todos los casos (Experimento 1a, 1b, 2a y 2b).

Para comparar los niveles medios de las hormonas esteroideas en el medio de cultivo al final de la maduración *in vitro*, el ratio $E_2: P_4$, las medias de las categorías foliculares y inmunolocalización del PRL-R entre dos tratamientos se utilizó el test *t*-student para variables independientes, utilizando el oocito y folículo respectivamente, como unidades experimentales. El incremento de las hormonas esteroideas durante la maduración *in vitro* dentro de cada grupo experimental se realizó comparando la concentración inicial con la final de dichas hormonas y se analizó mediante el test *t*-student del programa SPSS para variables relacionadas.

Análisis de las variables continuas (cuantitativas) sometidas a diferentes tratamientos experimentales en un momento puntual y que no siguen una distribución normal

Las concentraciones séricas de progesterona el día de la IA del Experimento 1a, se compararon mediante el test de Kruskal-Wallis de pruebas no paramétricas para muestras independientes.

Análisis de las variables categorizadas o no continuas (cualitativas) sometidas a diferentes tratamientos experimentales en un momento puntual

Para comparar los porcentajes medios de fertilidad obtenidos se utilizó el procedimiento CATMOD del SAS y se consideró a la coneja como unidad experimental. Se utilizó el test de χ^2 del programa SPSS para comparar las tasas de maduración nuclear y de migración de los gránulos corticales considerando el oocito como unidad experimental; para comparar el número de folículos apoptóticos, considerando el folículo como unidad experimental y; para comparar las categorías de embriones recogidos y la tasa de desarrollo embrionario *in vitro*, considerando el embrión como unidad experimental.

3.3.8.b. Capítulo 3

El efecto de la leptina sobre la esteroidogénesis de los COC y sobre la maduración *in vitro*, así como, las vías de señalización intracelulares a través de las cuáles actúa en el oocito de la coneja se analizaron con un diseño completamente al azar con el oocito como unidad experimental en todos los casos (Experimento 3).

Análisis de las variables continuas (cuantitativas) sometidas a diferentes tratamientos experimentales que siguen una distribución normal

Para comparar los niveles medios de las hormonas esteroideas existentes en los medios de cultivo al final de la maduración *in vitro* se utilizó el análisis estadístico ANOVA del programa SPSS para comparar más de dos variables independientes.

Análisis de las variables categorizadas o no continuas (cualitativas) sometidas a diferentes tratamientos experimentales

Para comparar el efecto de la adición de leptina sobre parámetros cualitativos se utilizó el test de χ^2 del programa SPSS. Se utilizó el oocito como unidad experimental para comparar las tasas de maduración nuclear y de migración de los gránulos corticales en todos los experimentos realizados.

En todos los estudios, se consideraron diferencias significativas entre medias a partir de $P < 0,05$ y los resultados han sido expresados bien como media, o como tasa o porcentaje acompañada del error estándar.

4. RESULTADOS

*CAPÍTULO 1: INFLUENCIA DE DIFERENTES ESTRATEGIAS
REPRODUCTIVAS SOBRE LA FISIOLOGÍA OVÁRICA DE LAS
CONEJAS PRIMÍPARAS EN EL MOMENTO DE LA
INSEMINACIÓN ARTIFICIAL*

EXPERIMENTO 1a. Estudio de la influencia del método de sincronización de estro mediante tratamientos hormonales con gonadotropina coriónica equina (eCG), o bien, con tratamientos no hormonales, mediante la separación transitoria de la camada, sobre la fisiología ovárica en conejas primíparas lactantes inseminadas en un periodo próximo al parto (día 11 post-parto).

Influence of hormonal and non-hormonal oestrous synchronization methods on follicular and oocyte quality in primiparous lactating does at early postpartum period

4.1.1. Resumen

En la mayoría de las granjas de producción cunícola europeas normalmente se insemina a las conejas el día 11 post-parto. Debido al efecto negativo que ejerce la lactación en este momento, es necesaria la aplicación de métodos de sincronización de estro efectivos que optimicen la función ovárica y por lo tanto mejoren el éxito reproductivo, sobre todo en conejas primíparas. Sin embargo, no existe ningún estudio que proporcione un fundamento fisiológico sobre el efecto que producen estos métodos a nivel folicular y oocitario. Así pues, el objetivo del Experimento 1a, fue valorar el impacto de dos métodos de sincronización de estro sobre el estatus ovárico en conejas primíparas lactantes inseminadas el día 11 post-parto: bien mediante el uso de hormonas como la eCG, administrada 48 horas antes de la IA (Grupo eCG), o bien, mediante tratamientos no hormonales alternativos como es la separación transitoria de la camada durante 24 horas antes de la IA (Grupo Bio) (ver esquema del diseño experimental).

Los resultados de este estudio mostraron niveles similares de estradiol y progesterona séricos, del número de folículos antrales y del índice de folículos con un grado avanzado de atresia en los dos métodos de sincronización estudiados. El grado de maduración nuclear de los oocitos, así como la síntesis esteroidogénica de los complejos cúmulo-oocito madurados *in vitro*, fue también similar en ambos grupos experimentales. Sin embargo, el grupo de animales sincronizados con el tratamiento hormonal presentó un aumento significativo del número de folículos antrales con un grado medio de atresia y una disminución en la tasa de maduración citoplasmática *in vitro* de los oocitos.

Según estos resultados, el método de sincronización de estro mediante la separación transitoria de la camada en conejas primíparas en el día 11 post-parto, supone que los animales presentan una mejor respuesta ovárica, relacionada con una mejor calidad folicular y mejor competencia de los oocitos, que cuando se usa un tratamiento hormonal con eCG. Por lo tanto, este estudio constata con una base fisiológica que el destete transitorio durante 24 horas previo a la IA, es un método eficaz de sincronización de estro alternativo al hormonal en conejas primíparas que siguen un ritmo de producción semi-intensivo.

4.1.2. Diseño experimental

El Experimento 1a se realizó con un total de 46 conejas primíparas, híbridas de Neozelandés blanco x California, a las cuales se les sometió al azar: a) a un tratamiento hormonal estándar aplicando 25 UI de eCG 48 horas antes de la IA (Grupo eCG, n = 23) ó; b) a un tratamiento experimental alternativo no hormonal, mediante la separación transitoria de la camada durante 24 horas previa a la IA (Grupo Bio, n = 23).

Los animales se eutanasiaron el día de la IA (día 11 post-parto) y se estudió el estatus ovárico de cada grupo experimental mediante la determinación de:

- ❖ los niveles medios de estradiol y progesterona séricos.
- ❖ la población de folículos antrales mayores de 1 mm presentes en la superficie del ovario.
- ❖ la población folicular a nivel histológico (número de folículos primordiales, primarios, secundarios y antrales).
- ❖ el porcentaje de folículos con un grado medio o avanzado de atresia mediante la técnica de TUNEL.
- ❖ el grado de maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos mediante el estudio de microscopía confocal.
- ❖ la capacidad esteroidogénica de los complejos cúmulo-oocito (secreción de estradiol y progesterona) durante su maduración *in vitro*.

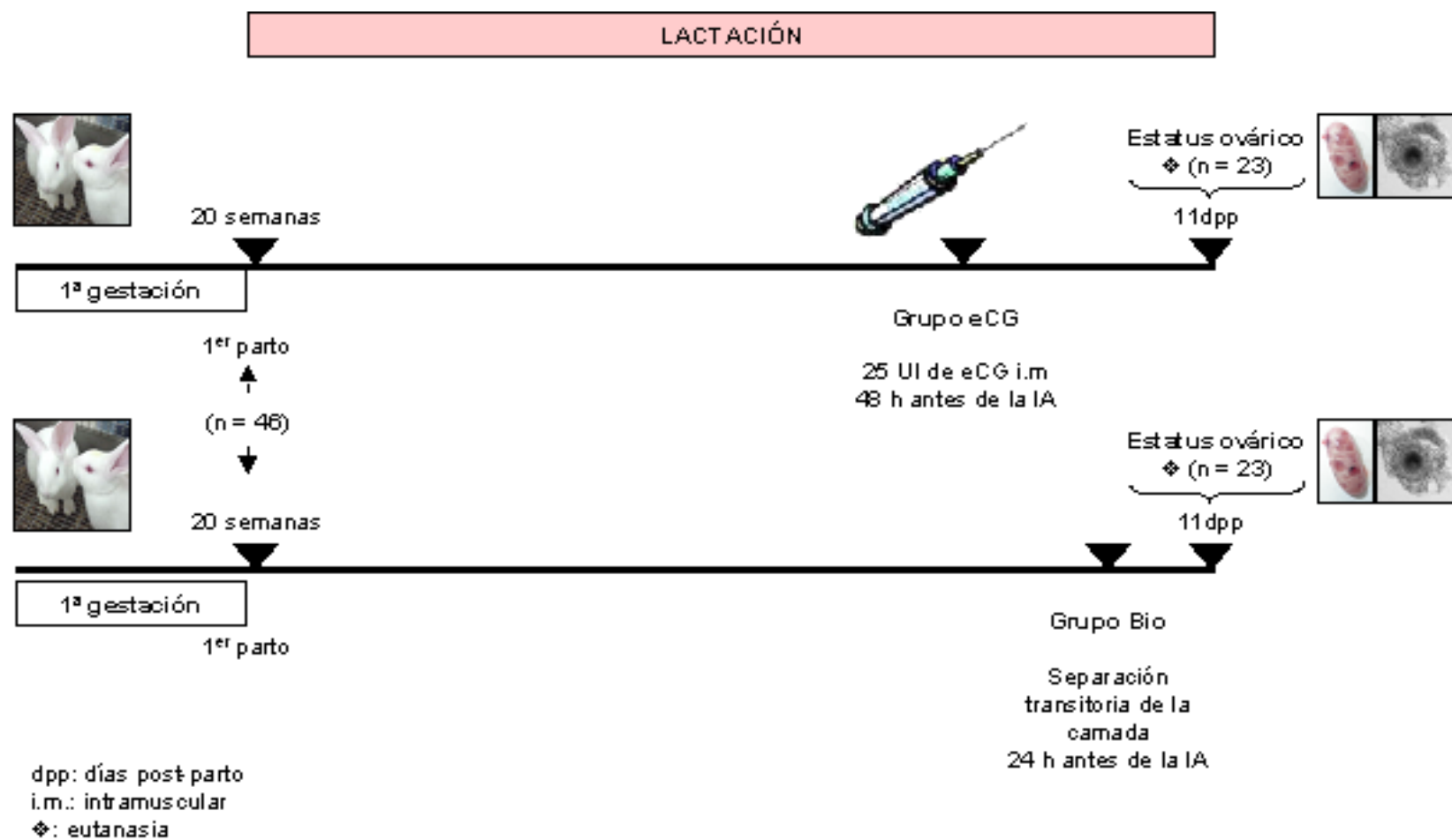


Imagen 4.1. Representación esquemática del diseño correspondiente al Experimento 1a, para determinar el estatus ovárico en conejas primíparas lactantes después de la administración de dos tratamientos de sincronización de estro: con eCG (Grupo eCG) o mediante destete transitorio 24 horas (Grupo Bio).

Elsevier Editorial System(tm) for Theriogenology
Manuscript Draft

Manuscript Number: THERIO-D-09-00223

Title: Influence of hormonal and non-hormonal estrus synchronization methods on follicular and oocyte quality in primiparous lactating does at early postpartum period

Article Type: Original Research Article

Keywords: eCG; Transient doe-litter separation; Follicular atresia; Oocyte maturation; Steroidogenesis

Corresponding Author: Dr Pedro L Lorenzo, DVM, PhD

Corresponding Author's Institution: Complutense University of Madrid

First Author: María Arias-Álvarez, PhD student

Order of Authors: María Arias-Álvarez, PhD student; Rosa María García-García, DVM, PhD; Laura Torres-Rovira, PhD student; Antonio González-Bulnes, DVD, PhD; Pilar G Rebollar, DVD, PhD; Pedro L Lorenzo, DVM, PhD

Abstract: High-yield lactating does need effective estrus synchronization methods to improve their reproductive outcome by enhancing ovarian function. The aim of the present work was to analyse ovarian follicular and oocyte characteristics of hormonal and non-hormonal estrus synchronization regimes in primiparous lactating rabbit does in the early postpartum (pp) period (Day 11). Females were randomly treated with: 1) an hormonal standard treatment with 25 IU equine chorionic gonadotropin (eCG) 48h before artificial insemination (AI) (eCG group), or 2) an alternative non-hormonal treatment consisting of doe-litter separation 24h before AI (Bio group). No significant differences were found in serum oestradiol and progesterone concentrations between experimental groups. During the histological study, the Bio group presented a higher number of primordial ($P<0.05$) and primary follicles ($P=0.07$) compared to the eCG group, whereas secondary and antral follicular populations were similar. Rates of late atretic follicles assessed by the TUNEL technique

were not different between treatments, but the eCG group showed a significantly higher number of mid-atretic follicles compared to the Bio group ($P < 0.05$). Nuclear in vitro oocyte maturation (IVM) - measured as metaphase II rate, and in vitro steroidogenic response of cumulus-oocyte complexes - measured by ELISA, did not show significant differences between treatments. However, confocal study showed that cytoplasmic maturation of oocytes, in terms of cortical granule migration rate, was significantly higher in the Bio group compared to the eCG treatment ($P < 0.05$). In conclusion, transient doe-litter separation seems to improve ovarian response in terms of follicular health and oocyte competence compared to the eCG treatment. Therefore, a 24h-long transient weaning could be an alternative non-hormonal method for synchronizing estrus in primiparous lactating rabbit does inseminated in the early postpartum period.

Influence of hormonal and non-hormonal estrus synchronization methods on follicular and oocyte quality in primiparous lactating does at early *postpartum* period

M. Arias-Álvarez^a, R.M. García-García^a, L. Torres-Rovira^b, A. González-Bulnes^b, P.G. Rebollar^c, P.L. Lorenzo^{a*}

^a*Dpto. Fisiología (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria, s/n, 28040, Madrid, Spain.*

^b*Dpto. Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos. INIA. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040, Madrid, Spain.*

^c*Dpto. Producción Animal. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria, s/n, 28040, Madrid, Spain.*

Short title: Ovary response to estrus synchronization in does

*Correspondence should be addressed to P. Lorenzo: plorenzo@vet.ucm.es

Phone number: 00 34 913943842

Fax: 00 34 913943835

Abstract

High-yield lactating does need effective estrus synchronization methods to improve their reproductive outcome by enhancing ovarian function. The aim of the present work was to analyse ovarian follicular and oocyte characteristics of hormonal and non-hormonal estrus synchronization regimes in primiparous lactating rabbit does in the early *postpartum* (*pp*) period (Day 11). Females were randomly treated with: 1) an hormonal standard treatment with 25 IU equine chorionic gonadotropin (eCG) 48h before artificial insemination (AI) (eCG group), or 2) an alternative non-hormonal treatment consisting of doe-litter separation 24h before AI (Bio group). No significant differences were found in serum oestradiol and progesterone concentrations between experimental groups. During the histological study, the Bio group presented a higher number of primordial ($P<0.05$) and primary follicles ($P=0.07$) compared to the eCG group, whereas secondary and antral follicular populations were similar. Rates of late atretic follicles assessed by the TUNEL technique were not different between treatments, but the eCG group showed a significantly higher number of mid-atretic follicles compared to the Bio group ($P<0.05$). Nuclear *in vitro* oocyte maturation (IVM) –measured as metaphase II rate, and *in vitro* steroidogenic response of cumulus-oocyte complexes – measured by ELISA, did not show significant differences between treatments. However, confocal study showed that cytoplasmic maturation of oocytes, in terms of cortical granule migration rate, was significantly higher in the Bio group compared to the eCG treatment ($P<0.05$). In conclusion, transient doe-litter separation seems to improve ovarian response in terms of follicular health and oocyte competence compared to the eCG treatment. Therefore, a 24h-long transient weaning could be an alternative non-hormonal method for synchronizing estrus in primiparous lactating rabbit does inseminated in the early *postpartum* period.

Key words: *eCG; Transient doe-litter separation; Follicular atresia; Oocyte maturation; Steroidogenesis*

1. Introduction

In European farms, rabbit does are normally inseminated on Day 11 after parturition. At this point in time, complex interactions among lactation, receptivity and ovarian competence reduce their fertility rate. For this reason, several estrus synchronization methods are used to increase female receptivity and reproductive outcome [1,2,3]. This management is especially important in primiparous rabbit does, whose reproductive performance is much lower than in multiparous does [4,5].

Treatment with equine chorionic gonadotropin (eCG) is the estrus synchronization method most commonly used in industrial rabbit breeding. This gonadotropin requires a single injection, since it has a relatively long circulating half-life [6]. eCG action is analogous to that of Follicle Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH), enhancing final follicular development and increasing fertility of primiparous lactating does by approximately 30% [5,7]. However, as far as we know, there are no reports about the effect of this hormone on induced-ovarian follicular atresia or quality of oocytes during the maturation period of primiparous does. In multiparous females, high doses of eCG increased the number of antral follicles developed [8]; also, standard doses of eCG stimulated *in vitro* oocyte maturation rate of treated does compared to non-synchronized rabbits [9]. In addition, the use of eCG promotes a decrease in fertility in subsequent inseminations due to immunogenicity when it is routinely used in rabbits [5,10]. Hormonal treatment is not well accepted by consumers because it leaves residues in the meat, and therefore the European Community is tightening controls on the use of hormones in meat-producing animals [1]. This brings back in perspective the importance of replacing the hormonal stimulation protocols based on

physiological considerations to optimise the yield and quality of embryos [11] and, therefore, the reproductive outcome.

Transient weaning, based on separating does from their litter for short periods of time prior to artificial insemination (AI) [12], is an alternative estrus synchronization technique to hormonal methods. Such management reduces plasma prolactin concentrations and increases serum oestradiol-17 β concentrations at AI time associated to a higher Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH)-induced LH surge [3,13]. However, transient-doe litter separation for 48h decreases the weight of litters at weaning [14] and slightly increases mortality of the young rabbits [5]. Therefore, a 24h-long separation period may be enough to stimulate oestradiol-17 β secretion and to induce estrus, in accordance to Ubilla et al. [13]. These endocrine changes near AI may determine the definitive competence of the oocytes close to the LH surge, which prepares them for the post-fertilization events [11]. As a consequence, transient doe-litter separation can improve the fertility rate of lactating does as previously reported [5,12] especially at first lactation [15,16]. However, in the literature there are no available studies especially focused in the ovarian follicular and oocyte differentiation reached with these methods in lactating primiparous does.

Therefore, the present work investigates the ovarian follicular (follicular categorization and atresia) and oocyte quality (steroid secretion by cumulus-oocyte complexes in culture and oocyte maturation) in response to a hormonal vs. non-hormonal estrus synchronization method in primiparous lactating does. Physiological basis of ovarian status after treatment with eCG or transient weaning prior to AI time (Day 11 *postpartum*) will shed light on the ovarian mechanisms influencing the successful reproductive outcome of these animals.

2. Materials and methods

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). All the experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Polytechnic University of Madrid (Spain), in compliance with the Spanish guidelines for the care and use of animals in research [17].

2.1. Animals and experimental design

New Zealand x California white rabbit does (*Oryctolagus cuniculus*) were held on the experimental farm at the Animal Production Department, Polytechnic University of Madrid (Spain). Animals were housed in individual flat-deck cages under a constant photoperiod of 16 h of light per day, a temperature of 18-22°C and a relative humidity of 60-75% maintained by a forced ventilation system. Primiparous does were fed *ad libitum* commercial pellet for lactating does (Cunimax A, Cargill S.A., Zaragoza, Spain) and litter size was equalized to eight kits one day after parturition. To assess the ovarian response to the estrus synchronization treatment, a total of 46 primiparous lactating does on Day 11 *postpartum* (*pp*), corresponding to the AI day, were used in three replicates. The females were randomly allocated on: a) eCG group (n = 23): rabbit does were intramuscular injected with 25 IU of eCG (Serigan, Ovejero, León, Spain) 48h before the AI time, according to the dose and time most commonly used in rabbit commercial farms, or; b) Bio group (n = 23): rabbit does were separated from their litters by a metal screen 24h before AI time, from Day 10 until Day 11 *pp* [12]. The day of AI, does were euthanasized with 30 mg/Kg of intravenous pentobarbital sodium (Dolethal, Vetoquinol, Alcobendas, Spain) and subjected to laparotomy in order to collect their ovaries. Serum were collected to assess oestradiol (E₂) and progesterone (P₄)

concentrations. Numer of follicles ≥ 1 mm in the ovarian surface of all ovaries were also recorded. Then, one ovary was used for histological and immunohistochemical assays, whereas the other one was used for the oocyte maturation experiment.

2.2. Blood sampling and serum steroids assay

Blood samples were collected from the margin ear vein into non-heparinized tubes at 9:00 h a.m. to avoid circadian variations. Serum was obtained after centrifugation at 1200 x g for 10 min at 4°C and stored at -32°C until analysed.

Oestradiol (E₂) and Progesterone (P₄). Serum E₂ and P₄ concentrations were measured in duplicate samples by specific chemiluminiscence methods (CMIA, Abbott laboratories, Abbott Park II., USA). For E₂ detection, purified rabbit anti-oestradiol monoclonal antibodies were used. P₄ detection was achieved by using rabbit anti-progesterone polyclonal antibodies. Intra and inter-assay coefficients of variation were 6.6% and 7% for E₂, and 5.8% and 6.3% for P₄, respectively. The detection limit was 10 pg/mL (E₂) and 0.2 ng/mL (P₄).

2.3. Study of follicular population

The number of preovulatory follicles ≥ 1 mm in size in the ovarian surface of both ovaries was first recorded. Then, one ovary per doe was placed into a 4% wt/vol buffered neutral paraformaldehyde solution (pH 7.2–7.4). All samples were gradually dehydrated with increasing concentrations of ethyl alcohol (50–100% v:v). These dehydrated specimens were first embedded in paraffin, prepared by sectioning at 5 μ m, and stained with hematoxylin/eosin. In order to study follicle population, four histological sections of each half

ovary was examined at the light microscope (Olympus BX40, Hamburg, Germany). Rabbit ovarian follicles were categorized into four specific development stages related to the number of layers of granulosa cells, according to Arias-Álvarez et al. [18] and Rebollar et al. [3] as: primordial, primary, secondary and antral follicles.

2.4. Follicular atresia assay

Strand breaks of DNA occurred during the granulosa cell apoptosis process were detected using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labelling (TUNEL; In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche Diagnostics S.L., Applied Science, Barcelona, Spain). Dewaxed, rehydrated sections by standard methods were first carried out. The slides were then pretreated with 20 µg/mL of proteinase K working solution for 30 min in a humidified dark chamber at 37°C. Incubation with the TUNEL reaction mixture took place in a humidified dark chamber at 37°C for 1 h. After each step of the procedure, sections were rinsed three times in phosphate-buffered saline (PBS). Finally, the slides were covered with Vectashield mounting medium with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, UK). Positive control sections were treated with DNase I (Roche Diagnostics S.L., Applied Science, Barcelona, Spain) for 10 min at room temperature in a humidified chamber before incubation with the TUNEL reaction mixture. For negative controls, samples were just incubated with the label solution of the TUNEL reaction mixture without the enzymatic solution. TUNEL-stained and DAPI-counterstained slides were observed under a fluorescent microscope (Leica, F550). Green fluorescence could be visualized only in TUNEL-positive cells. Four sections of each ovary in each experimental treatments were assessed. Follicles in early (Fig 1C) or late (Fig 1D) stage of atresia were examined according to Kasuya et al. [19]. Follicles in late atretic phase showed more than

50% of the granulosa cells labelled including the theca cells. Early atretic follicles were those in which apoptosis occur in less than 50% the granulosa cells. The percentage of apoptosis expressed is the number of TUNEL-highly or moderate positive follicles in each section divided by the total number of recorded follicles and antral follicles.

2.5. Oocyte collection and in vitro maturation (IVM)

The ovaries were placed in PBS at 37 °C and transported to the laboratory. Cumulus oocyte complexes (COC) were obtained by aspiration with a 2 mL syringe and a 25 ga needle from ovarian follicles ≥ 1 mm in size. The COC with compact cumulus cells were washed and placed in 500 μ l of maturation medium in four-well dishes (NuncTM Surface, NuncTM, Roskilde, Demark) and cultured for 16h at 38°C under an atmosphere of 5% CO₂ in air with maximum humidity. The maturation medium consisted of tissue culture media (TCM-199) with 2 mM L-glutamine, 0.1 mg/mL sodium pyruvate supplemented with 10% v:v foetal calf serum (FCS), 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF), and 100 ng/mL insulin growth factor (IGF), according to previous reports [9,20].

2.6. Confocal microscopy study

After the maturation period, COC were treated for the confocal study as previously is reported [26]. First, cumulus cells were removed in 2 mM hyaluronidase by gentle pipetting. Next, oocytes were treated with 0.5% wt/vol pronase to digest the zona pellucida, fixed in PBS containing 4% wt/vol-buffered neutral paraformaldehyde solution (pH 7.2–7.4) and stored in PBS. Oocytes were washed with permeabilization solution (0.02% v:v Triton X-100) and treated for 40 min with blocking solution (7.5% wt/vol bovine serum albumin). Then they

were incubated for 30 min at room temperature with 100 µg/mL lens culinaris fluorescein isothiocyanate (FITC-LCA) for cortical granule (CG) staining and for 15 min at 39°C with 10 µg/mL propidium iodide for nuclear staining. After that, oocytes were mounted between a coverslip and a glass slide supported by paraffin columns and examined under a confocal laser-scanning microscope (Leica, TCS SP5). Nuclear maturation was measured in terms of metaphase II rate (Fig 2B, 2C). According to a previous work [21], CG distribution was classified as follows: A) peripheral: CG were adjacent to the plasma membrane, (citoplasmically matured) (Fig. 2A); B) cortical: most of the CG were spread throughout the cortical area, (partially matured) (Fig. 2D); C) homogeneous: CG were distributed throughout the cytoplasm, (showed no cytoplasmic maturation) (Fig. 2E); D) non homogeneous or abnormal: anomalous distribution of CG (poor quality or degenerated oocytes) (Fig. 2F).

2.7. Determination of steroids in culture medium

Spent maturation media were collected before and after completion of oocyte maturation and stored at -32°C until analysed. Steroid concentration in the maturation medium were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the principle of competitive binding using a specific kit for oestradiol (Estradiol sensitive ELISA, Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany), and for progesterone (Progesterone ELISA, Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany) quantification. Purified anti-oestradiol and anti-progesterone polyclonal antibodies were used. Intra and inter-assay coefficients of variation were 5.5% and 6.8% for E₂, and 5.4% and 9.9% for P₄, respectively. The range of the assay was between 0-200 pg/mL (E₂) and between 0-40 ng/mL (P₄). Results are expressed as the average E₂ and P₄ levels produced by mean of each COC after IVM period. *Ratio E₂: P₄* was calculated as E₂

divided by P₄ both in pg/mL, although otherwise the E₂ concentration was expressed in pg/mL and P₄ concentration in ng/mL.

2.8. Statistical analysis

Data were analysed using the SPSS program for Windows (SPSS 15.0, Inc, Chicago, IL). Means of ovary weight, serum oestradiol concentrations, *ratio E₂:P₄*, oestradiol and progesterone levels in spent medium and follicular categorization between experimental groups (eCG vs. Bio) were compared by protected t-student test for independent samples. Serum progesterone concentrations were analysed by a Kruskal-Wallis-non parametrical analysis for independent samples. Average increase of oestradiol and progesterone levels in spent media in each experimental group was analysed by a protected t-student test for repeated samples. Chi-square test was carried out to analyse follicular apoptosis index over total number of follicles and to compare nuclear maturation and cortical granule migration index of IVM oocytes between experimental groups of synchronization. All the results are expressed as the mean ± SEM and statistical significance was accepted for $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Serum steroid concentrations and features of follicular population

As shown in Table 1, no significant differences were found in average serum oestradiol and progesterone concentrations, as well as in the mean of total preovulatory ≥ 1 mm follicles in the ovarian surface per ovary between groups at AI time. A total of 14122 follicles (eCG group: n = 4985; Bio group: n = 9137) were histologically categorized. Means of primordial

and primary follicles were higher in the Bio group than in the eCG group ($P < 0.05$ and $P = 0.07$, respectively). No significant differences were found in the means of secondary and antral follicles per ovary between synchronization methods.

3.2. Follicular apoptosis index

Atresia rate was studied in a total of 1926 follicles (eCG group: $n = 830$; Bio group: $n = 1096$). Positive control sections showed widespread nuclear labelling. In negative controls, no cell labelling was observed. Apoptotic cells were localized predominantly in granulosa cell layers of small and medium antral follicles in both groups, as shown in Fig. 1. Mean index of follicles with advanced stages of atresia was similar in both experimental treatments (Table 1). However, the number of follicles with moderate atresia was significantly higher in does synchronized with eCG compared to the Bio group ($P < 0.05$).

3.3. Nuclear and cytoplasmic oocyte maturation

A total of 339 COC (eCG group: $n = 168$; Bio group: $n = 171$) were analyzed by confocal study. As depicted in Table 1, the percentage of oocytes reaching metaphase II (MII) was similar between both synchronization treatments. The Bio group showed a significantly higher rate of oocytes with peripheral cortical granule (CG) migration ($P < 0.05$) and slightly lower homogeneous distribution of CG compared to the eCG group ($P = 0.06$). No statistical differences were found in the rate of oocytes with incomplete and abnormal, non-homogeneous CG migration.

3.4. Steroid production of COC

269

270 Mean oestradiol and progesterone secretions of each COC during maturation are shown in
271 Table 1. When we analyzed the culture medium for presence of steroid hormones before
272 maturation, it was found to contain 12.66 pg/mL of E₂ and 0.21 ng/mL of P₄. Analysis of
273 oestradiol and progesterone concentrations in spent media resulted in an increase but
274 differences did not reach statistical significance both in the Bio (E₂: 50.0 pg/mL and P₄: 0.3
275 ng/mL) and in the eCG group (E₂: 67.3 pg/mL and P₄: 0.6 ng/mL). No significant differences
276 were found in E₂ and P₄ concentrations or in the E₂: P₄ ratio at the end of the IVM period
277 between the experimental groups (Table 1).

278

279 4. Discussion

280

281 The present work evidences for the first time that transient doe litter separation seems to
282 induce healthier ovarian follicular features than eGC-conventional treatments in the
283 primiparous-lactating does reproductive context. These findings give us the ovarian
284 physiological basis that this method could be a non-hormonal alternative for estrus
285 synchronization in this species.

286

287 During *postpartum* period, approximately 60% of lactating primiparous does are infertile,
288 highlighting the negative effect of lactation on reproduction in such period [22,23]. It has
289 been reported that transient weaning in lactating does reduces serum prolactin concentrations
290 at the AI time, improving FSH secretion, which enhances ovarian follicular development and
291 steroidogenesis [13,24]. In the current work, the Bio group tended to have a higher number of
292 primary follicles recruited into the growing pool compared to the eCG-treated does, in
293 agreement to previous results in gilt [25] and rabbit [3]. However, we observed no increase in

the number of large antral follicles or in serum oestradiol concentrations in the eCG synchronized group compared to the biostimulated does, in spite of the FSH action of the eCG hormone. Probably, serum FSH and LH concentrations may improve in biostimulated does, as reported previously in rabbits [3,13,24,26]. This could lead to similar rates of final follicular development and steroidogenesis for both synchronization methods.

On the other hand, the present study showed that follicular apoptosis was a process occurring mainly in granulosa cells, but scattered theca cells were also involved in grossly atretic follicles as previously reported [27,28]. In this case, we have observed that apoptosis process was mainly produced in small and medium antral gonadotropin-dependent follicles (62.1% vs. 62.8%, Bio and eCG groups, respectively, data not shown), according to previous reports in rabbits [9,29] and other species [30-32]. The susceptibility to apoptosis at the late stage of development may be due to the acquisition of endogenous DnaseI by antral, but not preantral, follicles as suggested in rats [33]. In rabbits, the high atretic follicular rate is also probably due to the continuous growing and regressing of follicular waves when ovulation is not induced [29,34]. Moreover, in the current work, both groups showed similar populations of follicles with late stage of atresia. Follicular atresia with high prevalence of granulosa cell death and apoptotic bodies is accompanied by a decrease in oestradiol secretion by follicles resulting from the loss of granulosa cell aromatase activity in ewe [35]. This is in agreement with the similar steroid serum concentrations at AI time found in both groups during this study. However, the number of early atretic follicles was increased in the eCG group. This suggests that synthetic gonadotropins initiate the differentiation of granulosa cells and render them especially susceptible to apoptosis [32] without an appreciable decrease in the aromatase capacity and in the production of oestradiol according to Jolly et al. [36]. In other species, it has also been reported that the relatively long half-life of circulating eCG could alter the

length of the follicular phase [37] and induce formation of early atretic follicles [38,39]. In rabbits, eCG stimulation of the ovaries might involve early apoptosis of the granulosa cells [40] and recruitment of an asynchronous cohort of follicles, including both small and over-aged ones [41]. Also, the LH component of the eCG preparation causes premature luteinisation of follicles [42], causing ovulation of aged oocytes [43].

Thus, the synchronization method may influence the follicular environment in which the oocyte finishes its growth phase and could be involved in the oocyte competence to undergo two aspects of maturation: nuclear and cytoplasmic [44-46]. There is a general consensus about the fact that follicles entering the late atretic phase should contain oocytes which result in a poor developmental rate until the blastocyst stage [45,47]. In this sense, it was reported that hormonal synchronization is associated with a decrease in oocyte competence in ewes [37,48] and with oocyte-structural abnormalities in heifers [49]. Besides, Jewgenow et al. [50] suggested that before morphological signs of severe atresia were detected, apoptotic death cell reduced oocyte developmental capacity. According to these findings, the present study showed similar nuclear maturation rates between experimental groups; however, cytoplasmic maturation, in terms of complete cortical granule migration, was enhanced in biostimulated does, in which lower rate of early follicular atresia was found.

During the oocyte maturation period, cumulus-oocyte complexes secrete steroids in several species as rabbit [20], cattle [51] and ewe [52]. The *E:P ratio* observed in this study was considered to be a sign of the reduced quality of COC according to previous reports [53], and may be related to the high rates of atretic follicles found in both groups. This could be due to the compromised ovarian status showed by primiparous does in early *postpartum* period, according to previous results published by our group [5,54]. Previously, it was reported that

an increase in oestradiol production at the end of the culture period seemed to be related to the capability of oocytes to mature [20,55]. This suggests that steroids might play a physiological role in normal meiotic and cytoplasmic oocyte maturation by a paracrine/autocrine way [55]; however, such effect is species-dependent [56]. In this study, steroidogenic secretion by COC, *E:P ratio* and nuclear maturation index were similar at the end of the IVM period in both groups, establishing a possible involvement of oestradiol and progesterone in the meiotic maturation progress in rabbit oocytes, as previously reported [20,55]. Cumulus-oestradiol secretion seems to be involved in the Maturation Promoting Factor (MPF) activity [20], and in the activation of the Mitogen–Activated Protein Kinases (MAPK) pathway in the oocyte. They are essential for meiotic restarting and post-meiotic resumption events, such as spindle formation, MI to MII transition and MII arrest in several species [57], including rabbits [58]. Regarding cytoplasmic oocyte maturation, previous studies have shown that oocytes can stimulate cumulus oestradiol production when nuclear maturation of oocytes is accompanied by a correct cytoplasmic maturation [59]. Also, oestradiol secreted by cumulus cells could induce a rapid increase in free intracellular calcium concentration, enhancing cytoplasmic maturation [60-62] and fertilization [63]. In bovine oocytes it probably participates in the formation of the polyspermic block via cortical granules [64]. In contrast, other works suggest that steroids are not involved in the maturation process of several species [52,65,66], or even have a detrimental effect [67-69]. The findings obtained in this study suggest that, in line with the increase of early/mid-atretic antral follicles after eCG treatment, the lower oocyte cytoplasmic maturation of the eCG group could be related to other non-steroid-mediated mechanisms, given that no differences in the final COC steroid secretion during *in vitro* maturation have been observed between groups. This hypothesis and the elucidation of the physiological mechanisms that underline these observations will require further studies.

In conclusion, transient doe-litter separation induces an ovarian follicular development, nuclear maturation and steroidogenic response of cumulus-oocyte complexes which are similar to those of eCG treatment. However, does synchronized with eCG show high levels of moderate follicular atresia and lower oocyte competence in terms of cortical granule migration *in vitro*. Therefore, this ovarian physiological basis supports that a transient 24h weaning may be a valuable non-hormonal alternative method for estrus synchronization in primiparous lactating rabbit does inseminated in the early *postpartum* period.

Acknowledgements

This work was supported by MEC projects AGL07-60168, AGL08-022283 and UCM-CM research program (920249-2008). MAA has been granted a scholarship by CM and FSE, and RMGG was supported by the “Juan de la Cierva” MEC Program. The authors wish to thank Dr. L. Revuelta for his support in the experimental part of this work.

References

- [1] Castellini C. Recent advances in rabbit artificial insemination. Proceedings of the 6th World Rabbit Congress 1996; 13-26, Toulouse (France).
- [2] Theau-Clément M. Advances in biostimulation methods applied to rabbit reproduction. Proceedings of the 7th World Rabbit Congress 2000; 61-79, Valencia (Spain).
- [3] Rebollar PG, Bonanno A, Di Grigoli A, Tornambè G, Lorenzo PL. Endocrine and ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit does. Anim Reprod Sci 2008; 104: 316-328.

393 [4] Theau-Clément M, Lebas F. Effect of a systemic eCG treatment 48h before artificial
394 insemination on the productive performance of rabbit does. *World rabbit Sci* 1996; 4: 47-56.

395 [5] Rebollar PG, Milanés A, Pereda N, Millán P, Cano P, Esquifino AI, Villarroel M, Silván
396 G, Lorenzo PL. Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe-litter
397 separation or ECG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles. *Anim Reprod*
398 *Sci* 2006; 93: 210-230

399 [6] Siddiqui MA, Shamsuddin M, Bhuiyan MM, Akbar MA, Kamaruddin KM. Effect of
400 feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows.
401 *Reprod Domest Anim* 2002; 37: 37-41.

402 [7] Bourdillon A, Chmitelin F, Jarrin D, Perez V, Rouillère H. Effects of a eCG treatment on
403 breeding results of artificially inseminated rabbits. *Proceedings of the 5th World Rabbit*
404 *Congress* 1992; 25-30, Corvallis (USA).

405 [8] Bonnano A, Budetta G, Alabiso M, Alicata ML. Effeti del trattamento PMSG-GnRH
406 sull'efficienza delle coniglie. *Acta Med Vet* 1990; 36: 441-51.

407 [9] Garcia-Garcia RM, Arias-Alvarez M, Rebollar PG, Revuelta L, Lorenzo PL. Influence of
408 different reproductive rhythms on serum estradiol, testosterone levels, features of follicular
409 population and atresia rate, and oocyte maturation in controlled suckling rabbits. *Anim*
410 *Reprod Sci* 2008; in press. Doi:10.1016/j.anireprosci.2008.10.007.

411 [10] Boiti C, Castellini C, Canali C, Zampini D, Monaci D. Long term effect of PMSG on
412 rabbit does reproductive performance. *World Rabbit Sci* 1995; 3:51-56.

413 [11] Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo
414 quality. *Theriogenology* 2006; 65: 126-36.

415 [12] Alvariño JMR, Del Arco JA, Bueno A. Effect of mother–litter separation on reproductive
416 perfomance of lactating rabbit females inseminated on day 4 or 11 post partum. *World Rabbit*
417 *Sci* 1998; 6: 191-194.

418 [13] Ubilla E, Rebollar PG, Pazo D, Esquifino A, Alvariño JM. Effects of doe litter separation
 419 on endocrinological and productivity variables in lactating rabbits. *Livestock Sci* 2000a; 67:
 420 67-74.

421 [14] Bonanno, A., Mazza, F., Di Grigoli, A., Alicata, M.L., 2004. Effects of restricted feeding
 422 during rearing, combined with a delayed first insemination, on reproductive activity of rabbit
 423 does. *Proceedings of the 8th World rabbit Congress 2004*; 224–230, Puebla (México).

424 [15] Maertens L. Effect of flushing, mother-litter separation and PMSG on the fertility of
 425 lactating does and the performance of their litter. *World Rabbit Sci* 1998; 6: 185-90.

426 [16] Bonanno A, Di Griola A, Alabiso M, Boiti C. Parity and number of repeated doe-litter
 427 separation treatments affect differently the reproductive performances of lactating does.
 428 *World rabbit Sci* 2002; 10: 63-70.

429 [17] Boletín Oficial del Estado (BOE). Real Decreto 1201/2005. Sobre protección de los
 430 animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *B.O.E.* 2005; 252: 34367-
 431 34391.

432 [18] Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Lorenzo PL. Desarrollo folicular en
 433 la coneja. *ITEA* 2007; 103: 1-13.

434 [19] Kasuya K. The process of apoptosis in follicular epithelial cells in the rabbit ovary, with
 435 special reference to involvement by macrophages. *Arch Histol Cytol* 1995; 58: 257-64.

436 [20] Lorenzo PL, Illera JC, Silvan G, Munro CJ, Illera MJ, Illera M. Steroid-level response to
 437 insulin-like growth factor-1 in oocytes matured in vitro. *J Reprod Immunol* 1997; 35: 11-29.

438 [21] Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Nicodemus N, Revuelta L, Millán P,
 439 Lorenzo PL. Effects of a lignin-rich fibre diet on productive, reproductive and endocrine
 440 parameters in nulliparous rabbit does. *Livestock Sci* 2009; in press.

441 doi:10.1016/j.livsci.2008.10.013

442 [22] Lange K, Schlolaut W. The influence of post-partum insemination on litter size and
 443 growth of New Zeland White rabbit. Proceedings of the 4th World Rabbit Congress 1989;
 444 130-140, Budapest (Hungary).

445 [23] Rebollar PG, Ubilla E, Alvariño JM, Illera JC, Silván G. Effect of the level of sexual
 446 receptivity on plasma oestradiol and the ovulatory response during the postpartum period in
 447 the rabbit. *Rev Esp Fisiol* 1992; 48: 13-7.

448 [24] Ubilla E, Rebollar PG, Pazo D, Esquifino AI, Alvariño JM. Pituitary and ovarian
 449 response to transient doe-litter separation in nursing rabbits. *J Reprod Fertil* 2000b; 118: 361-
 450 6.

451 [25] Guthrie HD, Bolt DJ, Cooper BS. Effects of gonadotropin treatment on ovarian follicle
 452 growth and granulosa cell aromatase activity in prepuberal gilts. *J Anim Sci* 1990; 68: 3719-
 453 26.

454 [26] Cano P, Jiménez-Ortega V, Alvarez MP, Alvariño M, Cardinali DP, Esquifino AI. Effect
 455 of rabbit doe-litter separation on 24-hour changes of luteinizing hormone, follicle stimulating
 456 hormone and prolactin release in female and male suckling pups. *Reprod Biol Endocrinol*
 457 2005; 27: 3-50.

458 [27] Palumbo A, Yeh J. In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular
 459 atresia. *Biol Reprod* 1994; 51: 888-95.

460 [28] Matikainen T, Perez GI, Zheng TS, Kluzak TR, Rueda BR, Flavell RA, Tilly JL.
 461 Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling
 462 in the ovary. *Endocrinology* 2001;142: 2468-80.

463 [29] Kranzfelder D, Korr H, Mestwerdt W, Maurer-Schulze B, 1984. Follicle growth in the
 464 ovary of the rabbit after ovulation-inducing application of human chorionic gonadotropin.
 465 *Cell Tissue Res* 238: 611-20.

466 [30] Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK,
 467 Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Tsonis CG. A model for follicle
 468 selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev* 1993; 5: 459-
 469 78.

470 [31] Logothetopoulos J, Dorrington J, Bailey D, Stratis M. Dynamics of follicular growth and
 471 atresia of large follicles during the ovarian cycle of the guinea pig: fate of the degenerating
 472 follicles, a quantitative study. *Anac Rec* 1995; 243: 37-48.

473 [32] Kim JM, Boone DL, Auyeung A, Tsang BK. Granulosa cell apoptosis induced at the
 474 penultimate stage of follicular development is associated with increased levels of Fas and Fas
 475 Ligand in the rat ovary. *Biol Reprod* 1998; 58: 1170-76.

476 [33] Boone DL, Yan W, Tsang BK. Identification of a deoxyribonuclease I-like endonuclease
 477 in rat granulosa and luteal cell nuclei. *Biol Reprod* 1995; 53: 1057-65.

478 [34] Boiti C. Underlying physiological mechanism controlling the reproductive axis of rabbit
 479 does. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress* 2004;186-206, Puebla (Méjico).

480 [35] McNatty KP, Hudson NL, Henderson KM, Lun S, Heath DA, Gibb M, Ball K,
 481 McDiarmid JM, Thurley DC. Changes in gonadotrophin secretion and ovarian antral
 482 follicular activity in seasonally breeding sheep throughout the year. *J Reprod Fertil.* 1984; 70:
 483 309-21.

484 [36] Jolly PD, Tisdall DJ, De'ath G, Heath DA, Lun S, Hudson NL, McNatty KP. Granulosa
 485 cell apoptosis, aromatase activity, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response to
 486 gonadotropins, and follicular fluid steroid levels during spontaneous and induced follicular
 487 atresia in ewes. *Biol Reprod* 1997; 56: 830-36.

488 [37] Greve T, Callesen H, Hyttel P, Hoier R, Assey R. The effect of exogenous gonadotropins
 489 on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* 1995; 43: 41-50.

490 [38] Hughes FM Jr, Gorospe WC. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell
 491 death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia.
 492 Endocrinology 1991; 129: 2415-22.

493 [39] Sirard MA, Picard L, Dery M, Coenen K, Blondin P. The time interval between FSH
 494 administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes.
 495 Theriogenology 1999; 51: 699-708.

496 [40] Salvetti P, Theau-Clément M, Beckers JF, Hurtaud J, Guérin P, Neto V, Falières J, Joly
 497 T. Effect of luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does.
 498 Theriogenology 2007; 67: 1185-93.

499 [41] Boiti C., Besenfelder U., Brecchia G., Theau-Clément M., Zerani M. Reproductive
 500 physiopathology of the rabbit doe. In: Recent advances in rabbit sciences, Maertens L and
 501 Coudert L (Ed.), ILVO., 2006, pp. 3-20.

502 [42] Breuel KF, Baker RD, Butcher RL, Townsend EC, Inskeep EK, Dailey RA, Lerner SP.
 503 Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the
 504 superovulatory response of beef cows. Theriogenology 1991; 36: 241-55.

505 [43] Souza AH, Viechnieski S, Lima FA, Silva FF, Araújo R, Bó GA, Wiltbank MC,
 506 Baruselli PS. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a
 507 timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. Theriogenology 2009; in press.
 508 doi:10.1016/j.theriogenology.2008.10.025.

509 [44] Eppig JJ, O'Brien MJ, Pendola FL, Watanabe S. Factors affecting the developmental
 510 competence of mouse oocytes grown in vitro: follicle-stimulating hormone and insulin. Biol
 511 Reprod 1998; 59: 1445-53.

512 [45] Han BZ, Lan GC, Wu YG, Han D, Feng WG, Wang JZ, Tan JH. Interactive effects of
 513 granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, and cumulus

514 expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop
515 culture system. *Reproduction* 2006; 132: 749-58.

516 [46] Sendag S, Cetin Y, Alan M, Hadelar KG, Niemann H. Effects of eCG and FSH on
517 ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up
518 in Holstein cows. *Anim Reprod Sci* 2008; 106: 208-14.

519 [47] Blondin P, Sirard MA. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics
520 for developmental competence in bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* 1995; 41: 54-62.

521 [48] O'Callaghan D, Yaakub H, Hyttel P, Spicer LJ, Boland MP. Effect of nutrition and
522 superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone
523 concentrations in ewes. *J Reprod Fertil* 2000; 118: 303-13.

524 [49] Assey RJ, Hyttel P, Roche JF, Boland M. Oocyte structure and follicular steroid
525 concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. *Mol Reprod Dev* 1994; 39: 8-16.

526 [50] Jewgenow K, Heerdegen B, Müller K. In vitro development of individually matured
527 bovine oocytes in relation to follicular wall atresia. *Theriogenology* 1999; 51: 745-56.

528 [51] Mingoti GZ, García JM, Rosa-e-Silva AA. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine
529 cumulus oocyte complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of
530 steroids. *Anim Reprod Sci* 2002; 69: 175-86.

531 [52] Shirazi A, Moalemian Z. Ovine cumulus cells estradiol-17 β production in the presence or
532 absence of oocyte. *Anim Reprod Sci* 2007; 101: 125-33.

533 [53] Yu Y, Li W, Han Z, Luo M, Chang Z, Tan J. the effect of follicle-stimulating hormone
534 on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by
535 insulin-like growth factor-I in the goat ovary. *Theriogenology* 2003; 60: 1691-1704.

536 [54] Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Revuelta L, Millán P, Lorenzo PL.
537 Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different
538 postpartum periods in primiparous rabbit does. *Theriogenology* 2009; in press.

539 [55] Andersen CY. Characteristics of human follicular fluid associated with successful
540 conception after in vitro fertilization. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1227-34.

541 [56] Moudgal NR, Shetty G, Selvaraj N, Bhatnagar AS. Use of a specific aromatase inhibitor
542 for determining whether there is a role for oestrogen in follicle/oocyte maturation, ovulation
543 and preimplantation embryo development. *J Reprod Fertil Suppl* 1996; 50: 69-81.

544 [57] Liang CG, Su YQ, Fan HY, Schatten H, Sun QY. Mechanisms regulating oocyte meiotic
545 resumption: roles of mitogen- activated protein kinase. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2037-55.

546 [58] Yu HQ, Bou S, Chen DY, Sun QY. Phosphorylation of MAP kinase and p90rsk and its
547 regulation during in vitro maturation of cumulus-enclosed rabbit oocytes. *Zygote* 2002; 10:
548 311-16.

549 [59] Lucidi P, Bernabò N, Turriani M, Barboni B, Mattioli M. Cumulus cells steroidogenesis
550 is influenced by the degree of oocyte maturation. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1: 45: 1-9.

551 [60] Younis AI, Brackett BG, Fayrer- Hosken RA. Influence of serum and hormones on
552 bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res* 1989; 23: 189-201.

553 [61] Sirotkin AV. Involvement of steroid hormones in bovine oocyte maturation in vitro. *J*
554 *Steroid Biochem* 1992; 41: 855-58.

555 [62] Tesarik J, Mendoza C. Direct non- genomic effects of follicular steroids on maturing
556 human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. *Hum Reprod Update* 1997; 3: 95-
557 100.

558 [63] Yoshimura Y, Hosoi Y, Bongiovanni AM, Santulli R, Atlas SJ, Wallach EE. Are ovarian
559 steroids required for ovum maturation and fertilization? Effects of cyanoketone on the in vitro
560 perfused rabbit ovary. *Endocrinology* 1987; 120: 2555-61.

561 [64] Karlach V. The effect of FSH, LH, oestradiol-17 beta, and progesterone on cytoplasmic
562 maturation of bovine follicular oocytes in vitro. *Folia Biol (Praha)* 1987; 33: 258-65.

563 [65] Dode MAN, Graves C. Involvement of steroid hormones on in vitro maturation of pig
564 oocytes. *Theriogenology* 2003; 57: 811-21.

565 [66] Wang HF, Isobe N, Kumamoto K, Yamashiro H, Yamashita Terada T. Studies of the role
566 of steroid hormone in the regulation of oocyte maturation in cattle. *Reprod Biol Endocrinol*
567 2006; 4: 4.

568 [67] Barrett CB, Powers RD. Progestins inhibit murine oocyte meiotic maturation in vitro. *J*
569 *Exp Zool* 1993; 265: 231-39.

570 [68] Mingotti GZ, García JM, Rosa-e-Silva AAM. The effect of serum on in vitro maturation,
571 in vitro fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulose cells.
572 *Braz J Med Res* 1995; 28: 213-17.

573 [69] Can A, Semiz O. Diethylstilbestrol (DES)-induced cell cycle delay and meiotic spindle
574 disruption in mouse oocytes during in-vitro maturation. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 154-62.

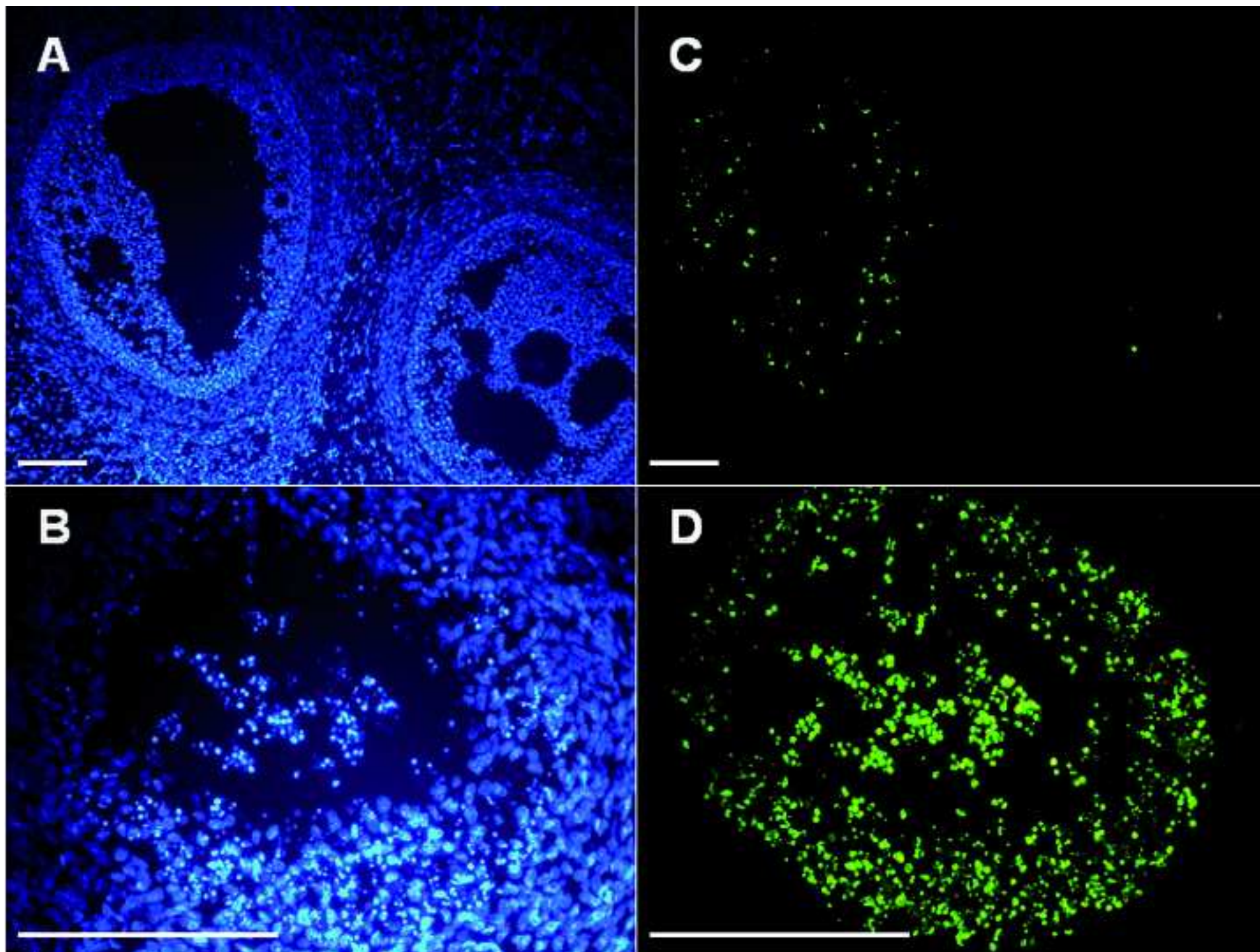
575 **Figure captions**

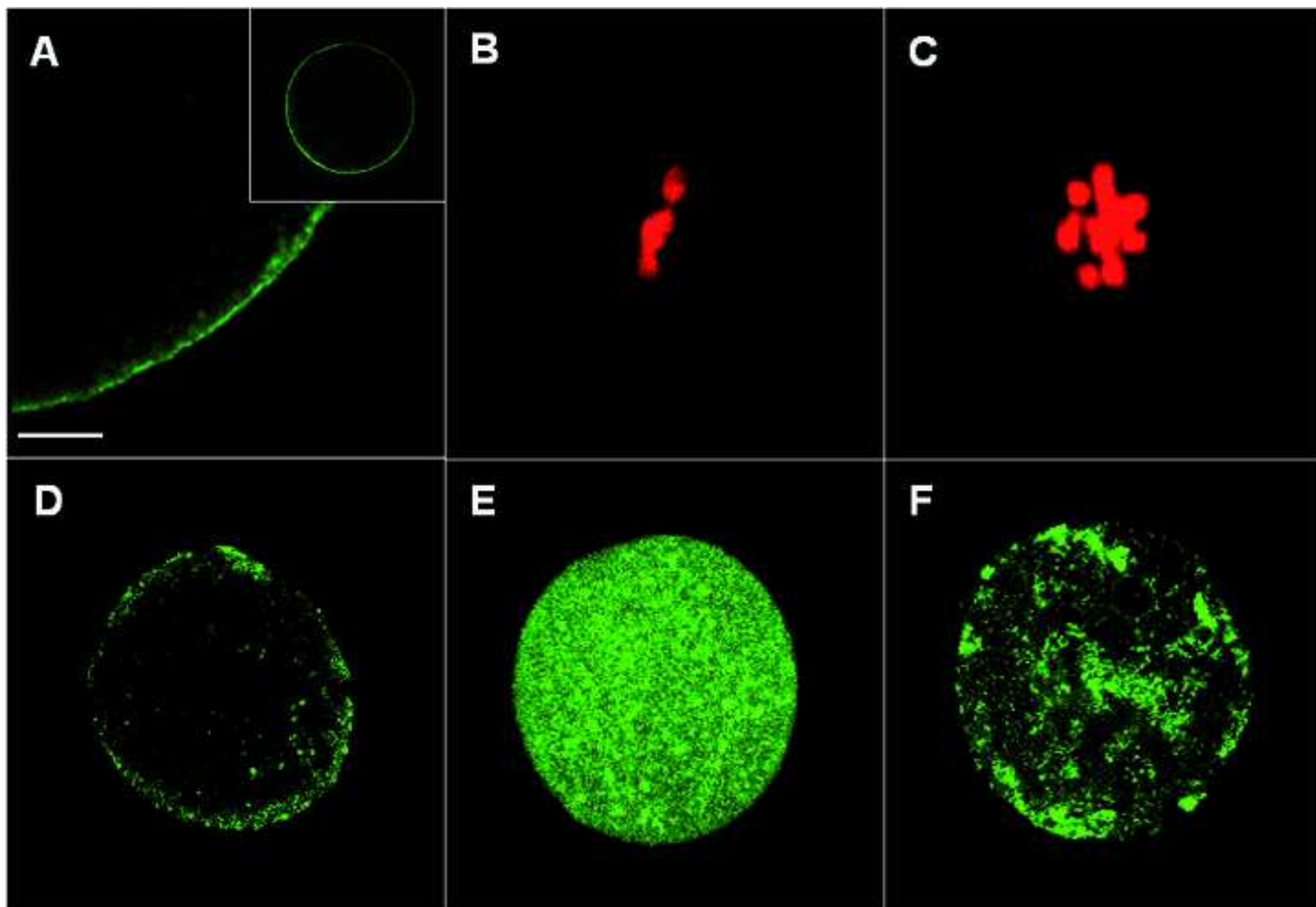
576

577 Figure 1. Follicular apoptosis at insemination time (Day 11 *postpartum*) measured by the
578 TUNEL technique in ovarian sections of primiparous rabbit does treated with eCG or
579 biostimulated; A, B) Control sections showing ovarian follicular cells marked with DAPI; C)
580 Follicular apoptotic cells are labeled, showing an early-atretic follicle (a, arrow) and a non-
581 atretic follicle (b, arrow); D) Follicular apoptotic cells are labeled, showing a late-atretic
582 follicle (arrow). Scale bar = 200µm.

583

584 Figure 2. Nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in terms of metaphase II and cortical
585 granule (CG) migration in primiparous rabbit does treated with eCG or biostimulated: A)
586 Peripheral CG distribution; B, C) Metaphase II; D) Cortical CG distribution; E)
587 Homogeneous CG distribution; F) Non-homogeneous or abnormal CG distribution. Scale bar
588 = 10µm. Oocyte diameter is around 80µm.





1 Table 1. Ovarian features at Day 11 *postpartum* of primiparous rabbit does synchronized with
2 eCG 48h or by transient weaning 24h before artificial insemination.

	eCG group	Bio group
Serum steroid concentrations		
Oestradiol 17 β (pg/mL)	27.6 \pm 2.0	25.3 \pm 2.4
Progesterone (ng/mL)	1.0 \pm 0.2	0.9 \pm 0.2
Mean of follicular population/ovary (n)		
Preovulatory follicles	7.0 \pm 0.5	7.3 \pm 0.7
Antral follicles	7.3 \pm 0.9	9.3 \pm 1.5
Secondary follicles	7.3 \pm 1.2	9.6 \pm 0.9
Primary follicles	12.5 \pm 1.5*	18.9 \pm 2.9*
Primordial follicles	104.8 \pm 13.4 ^a	176.5 \pm 29.4 ^b
Follicular apoptosis rate (%)		
Early atretic/total follicles	7.1 ^a	4.7 ^b
Late atretic/total follicles	11.7	11.7
Mean of steroid production/COC		
Oestradiol (pg/mL)	0.8 \pm 0.4	1.6 \pm 0.6
Progesterone (ng/mL)	0.01 \pm 0.008	0.004 \pm 0.003
<i>E₂:P₄ ratio</i>	0.1	0.2
Oocyte maturation (%)		
MII rate	60.4	67.1
CG migration rate		
Peripheral distribution	13.9 ^a	29.1 ^b
Cortical distribution	16.7	9.3

Homogeneous distribution	54.2 **	39.5 **
Abnormal distribution	15.3	22.1

3 Values are mean \pm SEM. Means in rows with different letters differ: ^{a, b} ($P < 0.05$). *($P =$
4 0.07), **($P = 0.06$).

Date: Mon, 11 May 2009 18:12:12 +0100

Dear Dr Lorenzo,

Your submission entitled "Influence of hormonal and non-hormonal estrus synchronization methods on follicular and oocyte quality in primiparous lactating does at early postpartum period" has been received by Theriogenology.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/therio/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Theriogenology

EXPERIMENTO 1b. Estudio del momento de la inseminación en relación al parto: día 11 post-parto (lactación temprana) o día 32 post-parto (después del destete) sobre la composición corporal y el estatus metabólico y ovárico en conejas primíparas.

Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different postpartum periods in primiparous rabbit does

4.2.1. Resumen

Las conejas primíparas inseminadas en un periodo cercano al primer parto presentan una reducción considerable en sus resultados reproductivos. Esto es debido, por un lado, al efecto negativo de la lactación, pero sobre todo lo es por el déficit energético y el estrés metabólico asociado; esto puede afectar sensiblemente en la calidad del folículo y en la competencia del oocito, siendo éstos los principales factores condicionantes que determinarían la reducción tan marcada de la fertilidad que presentan estos animales. Por lo tanto, la aplicación de ritmos reproductivos que se adapten a la fisiología de las hembras es necesaria, en particular en aquellos animales que se encuentran en su primera lactación. Así pues, el objetivo del Experimento 1b fue valorar la posible relación entre el estatus metabólico y ovárico en conejas primíparas en diferentes momentos del periodo post-parto (día 11 y día 32) que determinan el momento en el que se realiza la IA cuando se siguen dos ritmos reproductivos diferentes: semi-intensivo y extensivo respectivamente (ver esquema del diseño experimental).

Los datos obtenidos señalan que a lo largo del post-parto las reservas proteicas, grasas y energéticas corporales de las madres mejoraron, así como los niveles séricos de proteínas totales y leptina, mientras que las concentraciones de NEFA disminuyeron, reflejando una menor movilización de los depósitos grasos. Los resultados sobre el estatus ovárico en los días de la IA mostraron niveles similares de estradiol, progesterona y prolactina séricas, y una intensidad y distribución en la inmunolocalización del receptor de la prolactina en el ovario también similar, en ambos grupos experimentales. Sin embargo, los ovarios de las conejas inseminadas el día 11 post-parto presentaron un número más elevado de folículos atrésicos y una reducción marcada en la tasa de maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos *in vitro*, comparado con las conejas inseminadas después del destete. Como consecuencia, la fertilidad y la prolificidad se redujeron considerablemente en el grupo semi-intensivo.

Los resultados de este estudio muestran como el estrés metabólico y la composición corporal influyen sobre la fisiología ovárica, en particular sobre la tasa de atresia folicular y la competencia de los oocitos, dando lugar a índices reproductivos considerablemente inferiores. Basándonos en estos datos, se puede considerar que la IA después del destete podría ser una alternativa real de manejo reproductivo al menos en las conejas primíparas.

4.2.2. Diseño experimental

El Experimento 1b se realizó con un total de 90 conejas primíparas híbridas de Neozelandés blanco x California, a las cuales se les dividió al azar en dos grupos: a) hembras inseminadas el día 11 post-parto, siguiendo un ritmo semi-intensivo de producción el cuál, es el más utilizado en las granjas cunícolas europeas (Grupo S, n = 45); b) hembras que fueron destetadas el día 28 post-parto e inseminadas el día 32 post-parto siguiendo un ritmo de producción alternativo más extensificado (Grupo E, n = 45).

En diferentes momentos a lo largo de la lactación (al parto, el día 11 post-parto y el día 32 post-parto) se determinaron peso de las conejas, la composición corporal y los niveles séricos de proteínas totales, NEFA y leptina, relacionados con el estatus metabólico y la reserva energética de las madres.

El día de la IA además, se eutanasiaron un total de 15 animales por grupo experimental en los cuáles se determinaron:

- ❖ los niveles medios de estradiol, progesterona y prolactina séricos.
- ❖ la población de folículos antrales mayores de 1 mm presentes en la superficie del ovario.
- ❖ la población folicular a nivel histológico (número de folículos primordiales, primarios, secundarios y antrales).
- ❖ el porcentaje de folículos atrésicos mediante la técnica de TUNEL.
- ❖ la inmunolocalización del receptor de prolactina en el ovario.
- ❖ el grado de maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos mediante el estudio de microscopía confocal.

En los animales restantes se determinaron los parámetros de fertilidad y prolificidad al segundo parto.

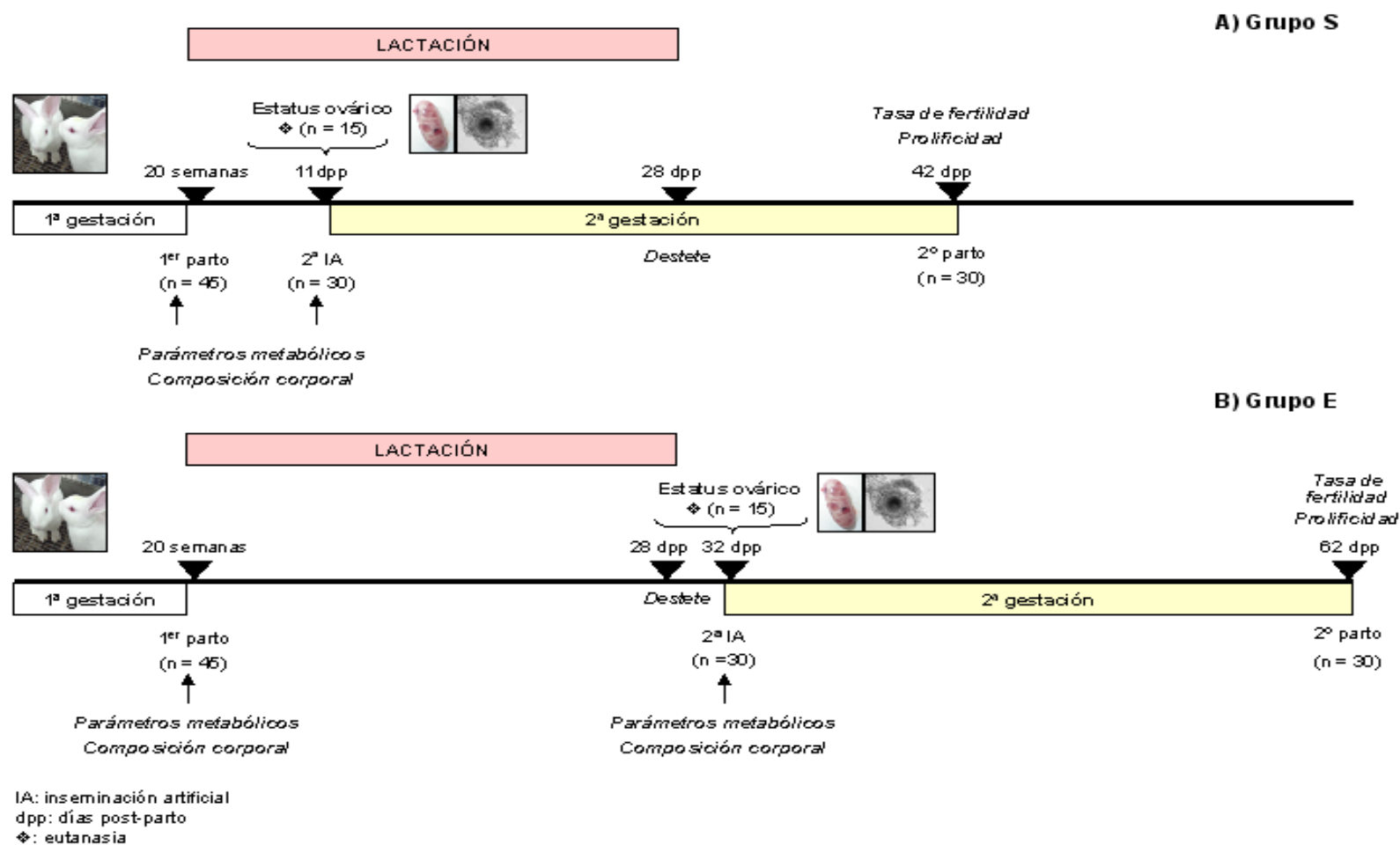


Imagen 4.2. Representación esquemática del diseño correspondiente al Experimento 1b, para estudiar la composición corporal, el estatus metabólico y ovárico en conejas primíparas en dos momentos del post-parto que determinan los ritmos reproductivos: semi-intensivo (Grupo S) y extensivo (Grupo E).



Influence of metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different postpartum periods in primiparous rabbit does

M. Arias-Álvarez^a, R.M. García-García^a, P.G. Rebollar^b, L. Revuelta^a, P. Millán^a,
P.L. Lorenzo^{a,*}

^aDepartamento de Fisiología (Fisiología Animal), Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria, s/n, 28040, Madrid, Spain

^bDepartamento de Producción Animal, ETSI Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, s/n, 28040, Madrid, Spain

Received 3 February 2009; received in revised form 24 March 2009; accepted 3 April 2009

Abstract

Low reproductive performance of high-yield primiparous animals is closely associated with the metabolic stress caused by a simultaneous gestation and lactation. The aim of this work was (1) to analyze body composition and metabolic environment at three time points along lactation (at parturition time; in the lactation period [Day 11 postpartum]; and in the postweaning period [Day 32 postpartum]) of primiparous rabbit does (*Oryctolagus cuniculus*) and (2) to investigate the ovarian status at insemination time and the possible link with metabolic environment and with their reproductive performance. To this end, does were either submitted to a semi-intensive reproductive rhythm (Group S, inseminated on Day 11 postpartum) or an extensive rhythm (Group E, inseminated on Day 32 postpartum). Body energy ($P < 0.05$) and protein content ($P < 0.001$) as well as serum leptin ($P < 0.05$) and protein concentrations ($P < 0.001$) increased significantly along the postpartum period. At parturition, body lipid content was significantly lower and serum nonesterified fatty acids concentrations were significantly higher than that on Days 11 postpartum and 32 postpartum. Concerning ovarian status at insemination time, no significant differences were found in mean follicular stages, serum estradiol, progesterone, and prolactin (PRL) concentrations or in prolactin receptor (PRL-R) immunostaining. However, follicles in Group S showed a significantly higher apoptosis index than that of Group E ($P < 0.001$). The nuclear and cytoplasmic oocyte maturation rates of Group S were also significantly lower than that in Group E. In addition, conception rate and prolificacy were improved in Group E ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively). In conclusion, in the early postpartum period, metabolic status seems to impact negatively on ovarian follicle and oocyte quality leading to a poor reproductive outcome in primiparous rabbit does. © 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Follicular atresia; Metabolism; Oocyte maturation; Postpartum; Rabbit

1. Introduction

Rabbits show high sexual receptivity immediately after kindling. Then, it decreases in a nonpredictable trend and another peak appears only after weaning [1]. However, as occurs in cattle [2], insemination of female rabbits during lactation seems particularly negative due to nutritional competition, leading to a

* Corresponding author. Tel.: +00 34 913943842; fax: +00 34 913943835.

E-mail address: plorenzo@vet.ucm.es (P.L. Lorenzo).

negative energy balance in these females [3,4]. This phenomenon is well known and particularly significant at the first parity in certain species [5,6]. Despite the rapid increase in doe feed intake during the early postpartum (postpartum) period, the doe is unable to cover its energetic needs for lactation of multiple litters, gestation, and its own growth [7]. Therefore, these animals show a poorer reproductive outcome than that of multiparous animals [2,8,9]. Artificial insemination (AI) around 11 days postpartum is the most common reproductive rhythm in commercial rabbit farms. It adapts well to cycled production, but this approach ignores the reproductive physiology of the females. This rhythm causes, especially in primiparous rabbit does, a pronounced reduction of conception rate mainly due to the low body condition and hormonal antagonism [10,11].

Body reserves status is reflected by changes in some metabolic parameters, such as serum protein, non-esterified fatty acids (NEFAs), and leptin concentrations [12]. They are present in follicles [13–15] and oviduct [16]; therefore, those parameters could affect the competence of the gametes before fertilization, which in turn influences oocyte maturation and presumably embryo survival [17–19]. In addition, during lactation, rabbit does show high prolactin (PRL) concentrations [20]. Prolactin is a hormone produced by the pituitary gland and also by extra-pituitary sites such as mammary gland, placenta, and uterus [21]. This hormone is the main responsible of the negative effect of lactation on the reproductive function [22]. The expression of PRL receptor in ovaries in several species [23,24] suggests a direct action of this hormone in follicular development and oocyte quality [25–27].

Most of the negative effects in the postpartum period due to metabolic stress and lactation status, which seem to affect follicle and gamete quality, have been extrapolated from studies in other species [5,28,29]. To our knowledge, no previous studies exist about the possible consequences on rabbit ovaries. In order to explain the observed decrease in reproductive performance, especially in primiparous does, the aim of this work was to study ovarian status at different insemination time points in terms of steroid concentrations and oocyte and follicle features. The evolution of metabolic parameters and body composition during the first postpartum period and the possible relationship of these parameters with the subsequent conception rate and prolificacy to establish the best physiology-based management for rabbit species were evaluated.

2. Materials and methods

Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). All the experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Polytechnic University of Madrid (Spain) in compliance with the Spanish guidelines for the care and use of animals in research [30].

2.1. Animals and experimental design

Along the study, New Zealand \times California white rabbit does (*Oryctolagus cuniculus*) were held on the experimental farm at the Animal Production Department, Polytechnic University of Madrid (Spain). Animals were housed in individual flat-deck cages under a constant photoperiod of 16 h light per day, a temperature of 18 to 22 °C, and a relative humidity of 60% to 75% maintained by a forced ventilation system. They were fed ad libitum a commercial pelleted diet for lactating does (Cunimax; Cargill S.A., Barcelona, Spain).

To evaluate metabolic serum parameters, ovarian status, and reproductive performance related to different postpartum periods, a total of 90 primiparous does were used. Litter size of does was equalized to eight kits one day after parturition. Does were randomly allocated in two experimental groups: Group S ($n = 45$), lactating does inseminated on Day 11 postpartum, following a semi-intensive reproductive rhythm; Group E ($n = 45$), postweaned lactating does inseminated on Day 32 postpartum, following an extensive reproductive rhythm. In Group S, all animals were estrus-synchronized by transient doe-litter separation before artificial insemination (AI). Biostimulated does were separated from their litters by a metal screen for 24 h before AI, from Day 10 until Day 11 postpartum [9,31]. In Group E, animals were estrus-synchronized by weaning 4 days before AI. In both rhythms, weaning was performed at Day 28 of the lactation period. Artificial inseminations were carried out using a pool of fresh heterospermic semen with more than 20 million spermatozoa in 0.5 mL commercial diluent (Magapor S.L., Zaragoza, Spain). Ovulation was induced by intramuscular injection of 1 μ g buserelin (Suprafact, Hoechst Marion Roussel S.A., Madrid, Spain). Conception rate (number of parturitions/number of inseminations \times 100) and prolificacy (total born and dead born per doe) were recorded for all animals inseminated.

At parturition time, at Day 11 postpartum and Day 32 postpartum, live body weight (LBW) and estimated

body composition were determined in 25 does/group. Metabolic parameters (serum leptin, NEFAs and protein concentrations) were recorded in 15 does/group. Body composition was determined by bioelectrical impedance analysis (BIA) according to multiple regression equations described by Pereda et al. [32] to estimate water, protein, ash, fat, and energy content (%) in relation to live body weight.

To study the ovarian status previous AI, 15 does/group were euthanasized with 30 mg/kg intravenous pentobarbital sodium (Dolethal; Vetoquinol, Alcobendas, Spain) and subjected to laparotomy in order to collect their ovaries. Serum PRL, estradiol (E_2), and progesterone (P_4) concentrations and ovary weight and follicles ≥ 1 mm in the ovarian surface were recorded. One ovary was used for histologic and immunohistochemical assays (follicular population categorization, follicular apoptosis index, and PRL receptor distribution), whereas the other one was used for the oocyte maturation assessment.

2.2. Blood sampling and metabolic and endocrine assay

Blood samples were collected from the margin ear vein into nonheparinized tubes at 0900 to avoid circadian variations. Serum was obtained after centrifugation at $1200 \times g$ for 10 min at $4^\circ C$ and stored at $-32^\circ C$ until analyzed.

2.2.1. Leptin

Serum leptin concentration was determined in duplicate samples using a multispecies leptin RIA kit (LINCO Research, St. Charles, MO, USA), as previously reported in rabbits [33]. Intra-assay and interassay coefficients of variation were 3.1% and 7.3%, respectively. The detection limit after adjusting the standard curve to rabbit values was 0.1 ng/mL HE human equivalent (HE).

2.2.2. Nonesterified fatty acids

Serum NEFA determination was performed in duplicate samples using the acyl-CoA synthetase-acyl-CoA oxidase (ACS-ACOD) method as prepared by Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan). The method is linear over the range from 0.0 to 2.0 mmol/L.

2.2.3. Protein

Serum total protein was determined by the Biuret method, according to Tietz [34]. In alkaline media, cupric ions interact with protein peptide bonds,

resulting in the formation of a colored complex. This method is linear up to 13 g/dL.

2.2.4. Estradiol and Progesterone

Serum E_2 and P_4 concentrations were measured in duplicate samples by specific chemiluminiscence methods (CMIA; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA). For E_2 detection, purified rabbit anti-estradiol monoclonal antibodies were used. Progesterone detection was achieved by using rabbit anti-progesterone polyclonal antibodies. Intra-assay and interassay coefficients of variation were 6.6% and 7% for E_2 and 5.8% and 6.3% for P_4 , respectively. The detection limit was 10 pg/mL (E_2) and 0.2 ng/mL (P_4).

2.2.5. Prolactin

Serum PRL concentration was measured in duplicate samples by means of a specific ELISA kit (USCN LIEF, Double Lake, MO, USA). This assay detects both recombinant and natural rabbit PRL. Intra-assay and interassay coefficients of variation were 7.7% and 8.4%, respectively. The minimum detectable dose of rabbit PRL was 0.039 ng/mL.

2.3. Study of follicular population

The number of preovulatory follicles in the ovarian surface ≥ 1 mm in size was first recorded. Then, one ovary per doe was placed into a 4% wt/vol buffered neutral paraformaldehyde solution (pH 7.2 to 7.4). All samples were gradually dehydrated with increasing concentrations of ethyl alcohol (50% to 100% vol/vol). These dehydrated specimens were first embedded in paraffin, prepared by sectioning at $5 \mu m$, and stained with hematoxylin and eosin. In order to study follicle population, histologic sections of each half ovary were examined at the light microscope (Olympus BX40; Olympus, Hamburg, Germany). Rabbit ovarian follicles were categorized into four specific development stages related to the number of layers of granulosa cells according to Arias-Álvarez et al. [35] and Rebollar et al. [36] as primordial, primary, secondary, and antral follicles.

2.4. Follicular atresia assay

Strand breaks of DNA occurring during the cell apoptosis process were detected using terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labeling (TUNEL; In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Roche Diagnostics S.L., Applied Science, Barcelona, Spain). Dewaxed, rehydrated sections by

standard methods were first carried out. The slides were then pretreated with 20 µg/mL proteinase K working solution for 30 min in a humidified dark chamber at 37 °C. Incubation with the TUNEL reaction mixture took place in a humidified dark chamber at 37 °C for 1 h. After each step of the procedure, sections were rinsed three times in phosphate-buffered saline (PBS). Finally, the slides were covered with Vectashield mounting medium with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, UK). Positive control sections were treated with DNase I for 10 min at room temperature in a humidified chamber (Roche Diagnostics S.L., Applied Science) before incubation with the TUNEL reaction mixture. For negative controls, samples were just incubated with the label solution of the TUNEL reaction mixture without the enzymatic solution. TUNEL-stained and DAPI-counterstained slides were observed under a fluorescent microscope (F550; Leica, Wetzlar, Germany). Green fluorescence could be visualized only in TUNEL-positive cells. Follicles in medium or advanced stage of atresia were examined according to Kasuya et al. [37], and the percentage of apoptosis expressed is the number of TUNEL-positive follicles divided by the total number of recorded follicles.

2.5. Immunohistochemistry of prolactin receptors

The protocol used was according to that described by García-García et al. [38]. Briefly, after slide deparaffinization and rehydration in graded alcohol, sections were heat-treated in sodium citrate solution (pH 6) to unmask antigen epitopes. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the slides with 1.5% vol/vol hydrogen peroxide in methanol for 15 min. Nonspecific binding of immunoglobulins was blocked with 3% vol/vol normal equine serum in Tris buffer solution (TBS) at room temperature for 30 min. Primary antibody against prolactin receptor (1:75, Affinity Bioreagents, Golden, CO, USA) was incubated overnight at 4 °C in a humidified chamber. The antibody used in this study specifically recognizes long and short forms of rabbit prolactin receptor (PRL-R). In the negative control sections, incubation with primary antibody was replaced by TBS. After that, samples were incubated for 30 min with biotinylated secondary antibodies (1:400, biotinylated anti-mouse IgG [H + L] made in horse; Vector Laboratories, Ltd.), and subsequently for 30 min with streptavidin–biotin–horseradish peroxidase complex (1:400, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, California, USA). After detection with

diaminobenzidine, sections were counterstained with hematoxylin, analyzed by the same observer, and photographed under the light microscope (Olympus BX40). To compare the expression of PRL-R in each category between both reproductive rhythms, follicular population was sorted into antral and preantral follicles. Prolactin receptor expression was analyzed using computer-aided image analysis (Metamorph Imaging System 7.5; Universal Image Corp., West Chester, PA, USA). In antral follicles, such program quantifies the follicular area expressing PRL-R. In addition, one threshold for negative staining and two thresholds for positive staining of PRL-R were established for moderate and strong chromatic intensity.

2.6. Oocyte collection and in vitro maturation

The remaining ovaries were placed in PBS at 37 °C and transported to the laboratory. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were obtained by aspiration with a 2-mL syringe and a 25-gauge needle from ovarian follicles ≥1 mm in size. Cumulus-oocyte complexes with compact cumulus cells were washed and placed in 500 µL maturation medium in 4-well dishes and cultured for 16 h at 38 °C under an atmosphere of 5% CO₂ in air with maximum humidity. The maturation medium consisted of tissue culture media (TCM-199) with 2 mM L-glutamine, 0.1 mg/mL sodium pyruvate supplemented with 10% vol/vol fetal calf serum (FCS), 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF), and 100 ng/mL insulin growth factor (IGF), according to Lorenzo et al. [39].

2.7. Confocal microscopy study

After the maturation period, a total of 301 COCs (Group S, n = 188; Group E, n = 113) were treated for the confocal study. First, cumulus cells were removed in 2 mM hyaluronidase by gentle pipetting. Next, oocytes were treated with 0.5% wt/vol pronase to digest the zona pellucida, fixed in PBS containing 4% wt/vol buffered neutral paraformaldehyde solution (pH 7.2 to 7.4), and stored in PBS. Oocytes were washed with permeabilization solution (0.02% vol/vol Triton X-100) and treated for 40 min with blocking solution (7.5% wt/vol bovine serum albumin). Then they were incubated for 30 min at room temperature with 100 µg/mL lens culinaris fluorescein isothiocyanate (FITC-LCA) for cortical granule (CG) staining and for 15 min at 39 °C with 10 µg/mL propidium iodide for nuclear staining. After that, oocytes were mounted between a coverslip

and a glass slide supported by paraffin columns and examined under a confocal laser-scanning microscope (TCS SP5; Leica). Nuclear maturation was measured in terms of metaphase II rate. According to a previous work [40], CG distribution was classified as follows (cf. Fig. 6): (A) peripheral: CGs were adjacent to the plasma membrane, showing they were cytoplasmically matured; (B) cortical: most of the CGs were spread throughout the cortical area, being considered as partially matured; (C) homogeneous: CGs were distributed throughout the cytoplasm, as they did not show cytoplasmic maturation; (D) nonhomogeneous or abnormal: anomalous distribution of CGs compatible with poor quality or degenerated oocytes.

2.8. Statistical analysis

Data were analyzed using the Statistical Analysis Systems (SAS/STAT User's Guide, Release 8.2; SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) and the SPSS program for Windows (SPSS 13.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). A MIXED procedure was used according to an autoregressive model to analyze repeated measures, including the effect of time (parturition, Day 11 postpartum, and Day 32 postpartum) with respect to LBW, estimated body condition, and serum metabolic parameters. Doe was considered a random effect nested in the treatment. Means were compared using a protected t-test. Means of serum estradiol, progesterone, and PRL concentrations, PRL-R, ovary weight, follicular categorization, and prolificacy (mean total born and dead born per doe) between experimental groups of insemination (11 postpartum vs. 32 postpartum) were compared by protected Student's t-test. Chi-square test was carried out to analyze conception rate (number of parturitions per number of inseminated does), follicular apoptosis index over total number of follicles, and to compare nuclear maturation and CG migration index of in vitro-matured oocytes between experimental groups of insemination. All the results are expressed as the mean \pm SEM, and statistical significance was accepted for $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Body composition and metabolic status during lactation of primiparous does

3.1.1. Live body weight and body composition

Similar LBW was found among time points measured (3957 ± 53.6 g, 3843.6 ± 34.7 g, and 3769.4 ± 63 g, at

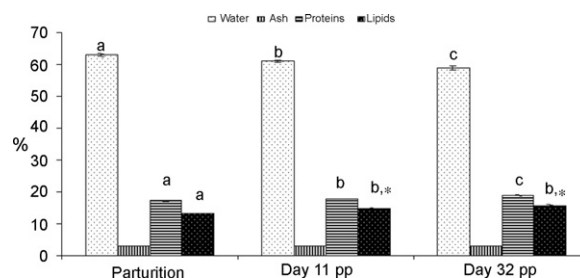


Fig. 1. Estimated body composition measured at different time points along the postpartum (pp) period (at parturition, on Day 11 postpartum [lactation], and on Day 32 postpartum [postweaned]) in primiparous rabbit does. Different letters in the same column indicate differences ($P < 0.05$). * $P = 0.09$.

parturition, Day 11 postpartum, and Day 32 postpartum, respectively). Estimated body composition is shown in Fig. 1 and energy content in Fig. 2A. Body protein and energy content of does were significantly increased along the postpartum period (body protein: $17.4 \pm 0.1\%$, $17.8 \pm 0.1\%$, and $19.0 \pm 0.1\%$; energy content: 1019.7 ± 16.3 kJ/100 g, 1094.7 ± 10.9 kJ/100 g, and 1139.3 ± 24.3 kJ/100 g; at parturition, Day 11 postpartum, and Day 32 postpartum, respectively). Lipid depots were statistically lower at parturition time compared with that obtained on Day 11 postpartum and Day 32 postpartum ($13.3 \pm 0.4\%$, $14.7 \pm 0.3\%$, and $15.6 \pm 0.6\%$, respectively, $P < 0.05$). Body lipid depot tended to be higher in animals undergoing an extensive rhythm than in those submitted to the semi-intensive one ($P = 0.09$). Water content significantly decreased along the postpartum period ($63.1 \pm 0.4\%$, $61.0 \pm 0.3\%$, and $59.0 \pm 0.6\%$ at parturition, Day 11 postpartum, and Day 32 postpartum, respectively). There were not found significant differences in body ash content ($3.1 \pm 0.0\%$, $3.1 \pm 0.0\%$, and $3.1 \pm 0.0\%$ at parturition, Day 11 postpartum, and Day 32 postpartum, respectively).

3.1.2. Metabolic parameters

Comparisons of serum metabolic parameters revealed a significant effect of the postpartum time point (Fig. 2B–D). Serum leptin and protein concentrations increased from parturition to the postweaning period (leptin: 1.6 ± 0.2 ng/mL, 3.0 ± 0.3 ng/mL, and 4.0 ± 0.0 ng/mL, $P < 0.05$; protein: 3.9 ± 0.1 g/dL, 5.2 ± 0.1 g/dL, and 6.0 ± 0.2 g/dL, $P < 0.001$). Serum NEFA concentrations were higher at parturition time ($P < 0.001$) compared with the values obtained on Day 11 postpartum and Day 32 postpartum, which did not show significant differences between them (0.7 ± 0.0 mmol/L, 0.3 ± 0.0 mmol/L, and 0.4 ± 0.1 mmol/L, respectively).

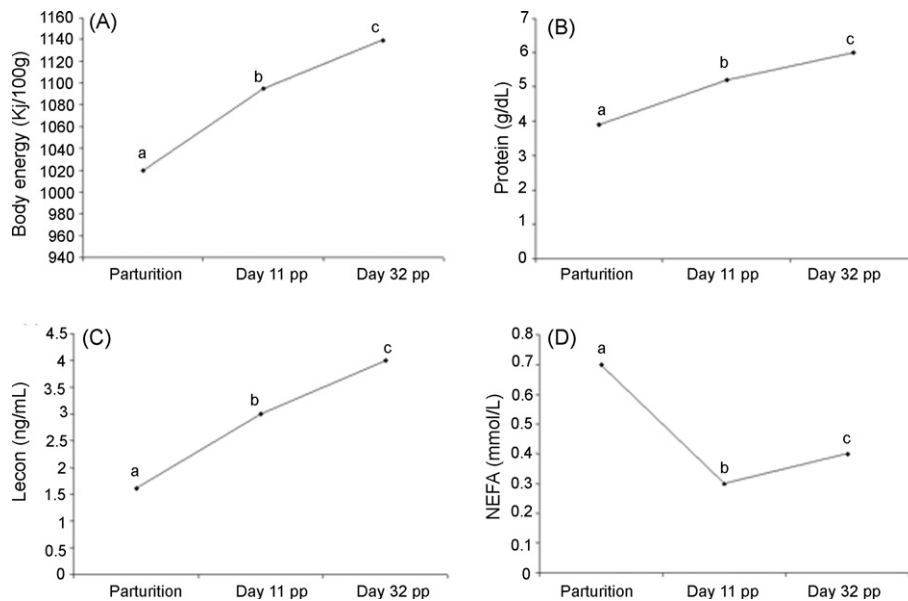


Fig. 2. (A) Body energy content and (B, C, D) serum parameters related to metabolic status measured at different time points along the postpartum (pp) period (at parturition, on Day 11 postpartum [lactation], and on Day 32 postpartum [postweaned]) in primiparous rabbit does. All samples were recovered at 0900. Different letters indicate differences ($P < 0.05$).

3.2. Ovarian status of primiparous does at artificial insemination time

3.2.1. Steroid concentrations

Serum E_2 concentrations did not show significant differences in both rhythms (16.2 ± 0.8 pg/mL vs. 20.5 ± 5.0 pg/mL, Group S and Group E, respectively). However, P_4 concentrations tended to be higher ($P = 0.07$) in the group inseminated at early postpartum compared with the extensive group (5.5 ± 1.7 ng/mL vs. 2.0 ± 0.6 ng/mL, respectively).

3.2.2. Features of follicular population and apoptosis index

Average ovary weight (338.0 ± 11.2 g vs. 361.2 ± 12.8 g) and mean of total preovulatory ≥ 1 mm follicles in the ovarian surface per ovary (10.0 ± 0.9 vs. 10.0 ± 0.7) were similar between groups. A total of 4282 follicles (Group S, $n = 2189$; Group E, $n = 2093$) were studied for categorization. No significant differences were found in the mean of primordial, primary, and secondary follicles per ovary between animals from each reproductive rhythm (3.3 ± 0.4 vs. 4.6 ± 1.1 ; 9.0 ± 1.9 vs. 7.1 ± 1.1 , 52.8 ± 7.2 vs. 63.5 ± 13.7 , respectively). However, the average number of total antral follicles/ovary were slightly higher in the semi-intensive group compared with that of the extensive one (8.7 ± 1.1 vs. 6.5 ± 1.0 ,

$P = 0.1$). In addition, atresia rate was studied in a total of 952 follicles (Group S, $n = 544$; Group E, $n = 408$). Apoptotic cells were localized predominately in antral granulosa layers (Fig. 3A, B), especially near the cumulus oophorus complex (Fig. 3C, D). Mean follicular apoptosis index was significantly higher in the group inseminated in the early postpartum period compared with that of the extensive group ($26.8 \pm 1.9\%$ vs. $15.4 \pm 1.7\%$ respectively).

3.2.3. Serum PRL concentrations and PRL-R in ovarian follicles

Serum PRL did not show significant differences either in lactating does (Group S) or in those postweaned (Group E) at AI time (3.8 ± 0.8 ng/mL vs. 7.2 ± 2.6 ng/mL, respectively). Positive immunostaining for PRL-R in oocyte, zona pellucida, cumulus cells, granulosa cells, and theca interna of the follicles at different stages of development was found in doe ovaries of both reproductive rhythms (Fig. 4B, C). Prolactin receptor was not immunolocalized in theca externa cells (Fig. 4B). Control tissue samples showed no positive staining (Fig. 4A). Quantification of PRL-R immunostaining did not show significant differences between Group S and Group E either for moderate ($91.5 \pm 1.5\%$ vs. $84.9 \pm 4.3\%$, respectively) or for strong chromatic intensity areas ($26.6 \pm 5.2\%$ vs. $18.7 \pm 3.3\%$, respectively).

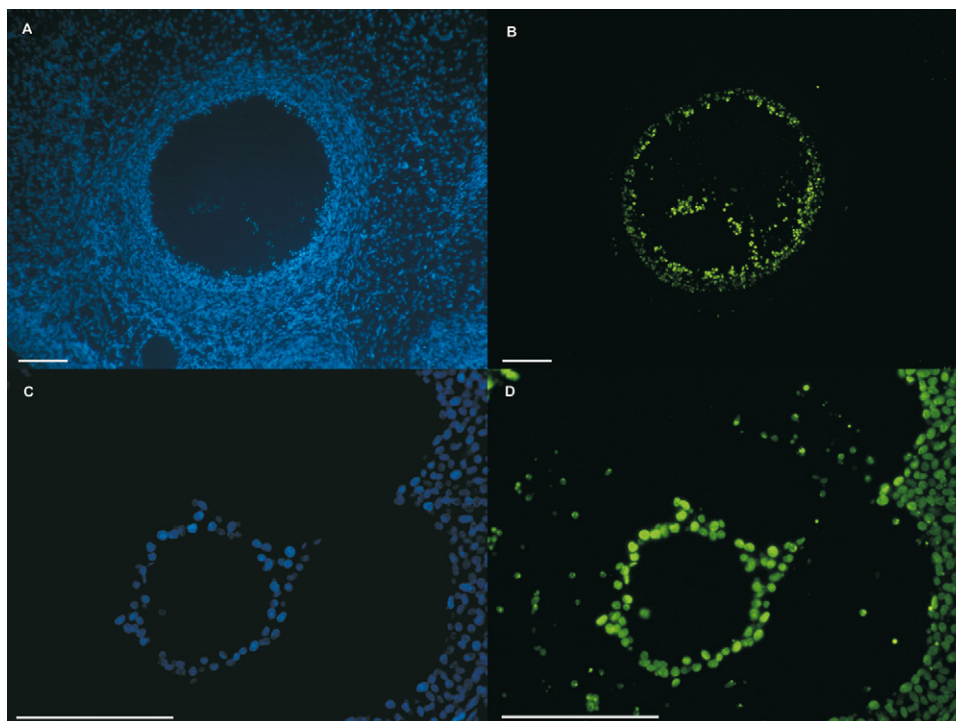


Fig. 3. Follicular apoptosis at insemination time measured by TUNEL in ovarian sections of primiparous rabbit does under semi-intensive (Group S) or extensive (Group E) rhythms. (A, C) Control sections showing ovarian cells marked with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI). (B) Follicular apoptotic cells labeled. (D) Detail of apoptotic cumulus cell. Scale bar = 200 μm.

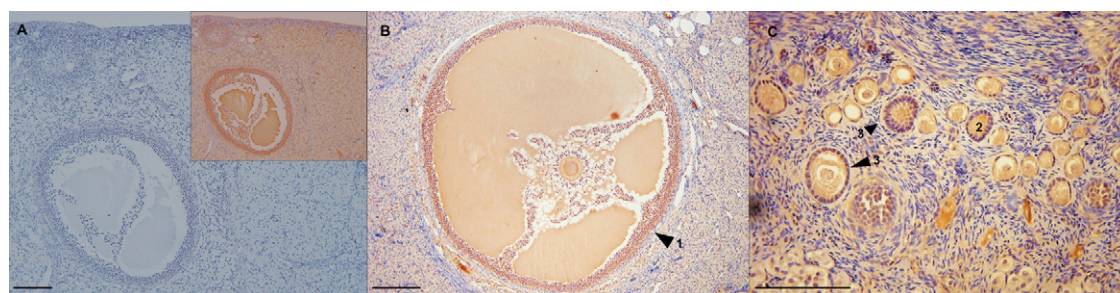


Fig. 4. Detection of PRL-R (arrowheads) by immunohistochemistry in ovarian sections of primiparous rabbit does under semi-intensive and extensive rhythms. (A) Negative control; (B) antral follicle (1) with strong staining of PRL-R in granulosa cells; (C) PRL-R in oocytes (2) and granulosa cells (3) in preantral follicular population. Scale bar = 200 μm.

3.2.4. Nuclear and cytoplasmic oocyte maturation

As shown in Fig. 5, in line with the follicular parameters measured, oocyte quality was also affected by the reproductive rhythm. Primiparous does of the extensive group showed a significant increase in the rate of oocytes reaching metaphase II (MII) compared with that of does inseminated in the early postpartum period ($84.3 \pm 3.4\%$ vs. $48.6 \pm 3.6\%$ respectively). The percentage of oocytes presenting peripheral CG migration was also statistically higher in the extensive group than in the semi-intensive one ($73.5 \pm 4.1\%$ vs.

21.3 ± 2.9 respectively, $P < 0.001$) (Fig. 6A). Animals inseminated at the early postpartum period (Group S) showed slightly more oocytes with incomplete CG migration ($20.2 \pm 2.9\%$ vs. $12.4 \pm 3.1\%$, $P = 0.08$; Fig. 6B) and significantly more oocytes with homogeneous CG distribution after in vitro maturation ($27.7 \pm 3.2\%$ vs. $13.3 \pm 3.2\%$; Fig. 6C); such oocytes were not considered as cytoplasmic matured. Besides, in Group S, an increase of abnormal, nonhomogeneous CG distribution was found compared with that of oocytes from does inseminated in the postweaning

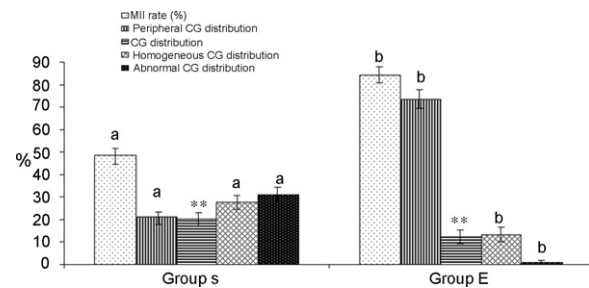


Fig. 5. In vitro oocyte maturation in primiparous does inseminated under semi-intensive or extensive rhythm. Nuclear and cytoplasmic maturation was measured in terms of metaphase II rate (MII) and cortical granules migration. Different letters in the same column indicate differences ($P < 0.05$). ** $P = 0.08$.

period ($30.9 \pm 3.3\%$ vs. $0.9 \pm 0.8\%$, $P < 0.001$; Fig. 6D).

3.2.5. Reproductive performance

The average conception rate and prolificacy of primiparous does was strongly affected by the reproductive rhythm used (Table 1). Animals inseminated in the early postpartum period (Day 11) showed about 40% lower conception rate compared with that of does in the extensive group (inseminated at Day 32 postpartum) ($P < 0.001$). Also, extensive group does had more kits live born (around four kits) than did females of the semi-intensive group.

4. Discussion

There is no doubt that complex interactions between energy requirements, lactation, and ovarian function can modulate fertility and prolificacy of the females during the early postpartum period, but these ovarian mechanisms have not been described properly in the rabbit. When physiologic conditions are optimal in rabbit does (nonlactating, sexually receptive, medium fat females), conception rate can reach values over 90% [41]. However, in contrast with the thought of high reproductive capacity of rabbits, this study shows that conception rate of primiparous does inseminated in the

Table 1

Reproductive parameters in primiparous rabbit does inseminated in the early postpartum (semi-intensive rhythm) or in the postweaning (extensive rhythm) period.

	Reproductive rhythm	
	Semi-intensive (Group S)	Extensive (Group E)
Conception rate (%)	45.1 ± 6.4^a	85.2 ± 8.8^b
Prolificacy (n)		
Total born per doe	9.3 ± 0.6^c	11.4 ± 0.6^d
Dead born per doe	2.0 ± 0.6^c	0.2 ± 0.6^d

Values are means \pm SEM. Means in rows with different letters differ: ^{a,b} $P < 0.001$; ^{c,d} $P < 0.05$.

early postpartum period is very low (45%), in agreement with previous reports [7,42–45]. Additionally, lower prolificacy values were obtained in the same group, in contrast with other authors, who found no difference in this parameter [41,44]. In other species, such as dairy cattle, body condition score is also affected by stage of lactation and parity order, which reflects in blood hormone and metabolite fluctuations [5]. In this sense, our study confirmed that a better body composition in terms of higher body protein, energy, and lipid content is associated with changes in metabolic signals, such as an increase in serum protein and leptin concentrations. This improvement may be associated with an increase in the reproductive outcome, according to other authors [7,11,12,45]. All of these findings strongly suggest that AI after weaning is the best management, at least for primiparous does, not affecting the global productivity of the females, as reported previously [11,43].

Prolactin effects are related to the presence of its receptor. In this study, PRL-R appears in different ovarian localizations, including granulosa cells and oocytes of antral follicles, according to previous results [23,38]. This finding evidences that PRL acts directly on rabbit follicles modulating follicular health and development [21]. However, we found no differences in PRL-R immunostaining and serum PRL concentration

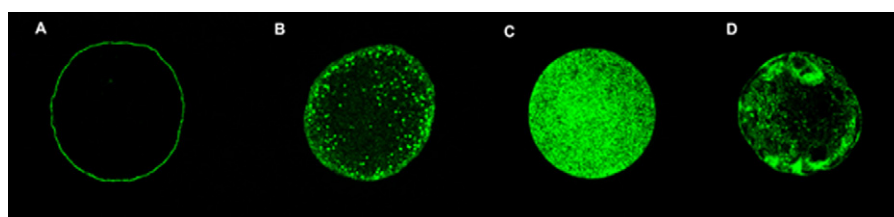


Fig. 6. Cytoplasmic oocyte maturation related to cortical granule (CG) migration: (A) Peripheral CG distribution; (B) cortical CG distribution; (C) homogeneous CG distribution; (D) nonhomogeneous or abnormal CG distribution. Oocyte diameter is around 80 μm .

or in serum E₂ concentration and antral follicular population at AI time between both reproductive rhythms. This could be a consequence of the estrus synchronization method of lactating does used in this study. Transient doe-litter separation allows a reduction of PRL concentrations at day of AI in the group inseminated in the early postpartum period; as a result, serum E₂ concentrations and follicular development improve as in the extensive group [9,46]. Measurements of serum E₂ levels have been used to assess antral follicular growth and their steroidogenic capacity [47]. However, the serum estradiol concentrations of lactating rabbit does are widely variable [48]; not reflecting the follicular status at a specific time point related to the apoptosis index [49], as is here also reported. Slightly higher concentrations of P₄ found in the semi-intensive group could also be adversely acting on oocyte maturation, gamete transport, and fertilization [50,51]. However, further specific studies are warranted in order to deepen our knowledge regarding steroid action on the ovary in the early postpartum period in rabbits. Besides, other factors could also be locally acting on the follicular environment, altering ovarian status and reproductive performance.

Some metabolic markers change according to body composition and energetic balance in animals, which also seem to affect reproductive function [12]. Non-esterified fatty acid concentrations generally point to mobilization of body lipids and are higher when negative energy balance is more pronounced [5,15]. Also, they have a proapoptotic effect on granulosa cells in vitro [52]. Body fat, energy, and protein requirements become particularly accentuated in the late pregnancy period [3] because of the development of the gravid uterus [6] and the strong fetal protein turnover [53]. That situation could give rise to higher serum NEFA concentrations at parturition time compared with subsequent postpartum time points determined in this study. In contrast with the results obtained in other species [15,54], but in agreement with previous result in rabbits [55], neither lactating does on Day 11 postpartum nor postweaned does showed differences in NEFA concentrations. Therefore, in the rhythms studied in this work, NEFAs do not appear to be the main factors affecting ovarian function in rabbits. However, serum protein and leptin concentrations increased through the postpartum period, reaching the highest values in the extensive group. Knowing that both groups were fed ad libitum with the same diet, lower concentrations of these metabolic parameters in the early postpartum period were probably related to doe lactation status and lower body condition. In this

sense, leptin is a hormone for which blood concentrations could reflect the amount of stored body fat and energy [56]; it influences rabbit reproductive function by modulating ovarian physiology through its receptor [6,33]. Leptin receptors have been detected in granulosa cells of follicles, oocytes, and oviducts [13,57–60]. In this sense, previous studies show that recombinant leptin in rats reduces incidence of follicular apoptosis [61]. In contrast, leptin deficiency in Ob/Ob mice is associated with impaired folliculogenesis, which results in increased follicular atresia [62]. In the current study, follicular apoptosis rate was higher in lactating primiparous does inseminated at the early postpartum period than in those under extensive rhythm. Thus, an increase in serum leptin concentrations on postweaning period may be one of the endocrine factors involved in the reduced incidence of follicular apoptosis in such group. In the current work, apoptotic cells were localized predominately in the antral granulosa layers, mostly near the cumulus oophorus complex, in agreement with previous reports [49,63,64]. As a consequence, the developmental potential of oocytes may be affected [65].

Oocyte maturation implies both nuclear and cytoplasmic maturation including CG migration [66,67]. The physiologic status of the animals is determining for oocyte developmental competence [68], as it is acquired during folliculogenesis, before the onset of meiosis [69]. In contrast with this premise, in the bovine model [70], it was recently reported that there was no effect of day postpartum on oocyte quality or in fertility [71]. However, other reports clearly show that conditions related to early lactation negatively affect oocyte quality and endocrine parameters of dairy cattle, effects that are especially pronounced after the first labor [5,15,72,73]. In the current study, oocytes matured in vitro from the group inseminated in the early postpartum period showed a decrease in both nuclear and cytoplasmic maturation rates compared with that of the oocytes of the extensive group. Additionally, in line with the follicular apoptosis results obtained, the percentage of oocytes with abnormal distribution of CG (considered as degenerated) was also higher in does inseminated in the early postpartum period, matching the results of Dominguez [72] in cattle. Therefore, the higher follicular apoptosis index associated with the lower oocyte quality obtained in such group may be an indicator of the impact of metabolic stress on the acquisition of oocyte developmental competence [74] and subsequent fertility [2].

Insemination after weaning improves (1) estimated body composition and energy content; (2) serum leptin

and protein concentrations; (3) health of follicular populations in the ovary, showing lower apoptosis rate; (4) oocyte quality, by enhancing oocyte maturation; and (5) as a consequence, conception rate and prolificacy are improved. Therefore, in this article we are reporting for the first time in rabbits some physiologic basis to support that insemination after weaning is the best management for primiparous does because it seems to fit better in the metabolic status and reproductive physiology of such animals. This should be considered when choosing strategies with a view to improving reproductive performance and economic benefits in rabbit farms. Finally, this study shows that rabbits can be a valuable model to study the effect of maternal metabolism on fertility.

Acknowledgments

This work was supported by Spanish Ministry of Education and Science (MEC) projects AGL05-0196, UCM PR1/07-14906, and UCM-CM research program (920249-2008). M.A.A. has been granted a scholarship by Comunidad de Madrid (CM) and European Social Funding (FSE), and R.M.G.G. was supported by the “Juan de la Cierva” MEC Program. The authors wish to thank M. Cuadrado, N. Pereda, and P. García-Palencia for their invaluable support in the experimental part of this work.

References

- [1] Ubilla E, Rebollar PG. Influence of the postpartum day on plasma oestradiol-17 β levels, sexual behaviour and fertility rate in artificially inseminated lactating rabbits. *Anim Reprod Sci* 1995;38: 337–44.
- [2] Lucy MC. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Soc Reprod Fertil* 2007;64(Suppl):227–54.
- [3] Parigi-Bini R, Xiccato G, Cinetto M, Dalle-zotte A. Energy and protein utilization and partition in rabbit does concurrently pregnant and lactating. *Anim Prod* 1992;55:153–62.
- [4] Pascual JJ, Cervera C, Blas E, Fernandez-carmona J. Effect of high fat diets on the performance and food intake of primiparous and multiparous rabbit does. *Anim Sci* 1998;66:491–9.
- [5] Walters AH, Bailey TL, Pearson RE, Gwazdauskas FC. Parity-related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum. *J Dairy Sci* 2002; 85:824–32.
- [6] Fortun-Lamothe L. Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Anim Reprod Sci* 2006;93:1–15.
- [7] Xiccato G, Trocino A, Boiti C, Brecchia G. Reproductive rhythm and litter weaning age as they affect rabbit doe performance and body energy balance. *Anim Sci* 2005;81:289–96.
- [8] Butler WR, Smith D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1989;72:767–83.
- [9] Rebollar PG, Milanés A, Pereda N, Millán P, Cano P, Esquifino AI, et al. Oestrus synchronisation of rabbit does at early postpartum by doe-litter separation or ECG injection: reproductive parameters and endocrine profiles. *Anim Reprod Sci* 2006;93: 210–30.
- [10] Theau-Clément M, Roustan A. A study on relationships between receptivity and lactation in the doe, and their influence on reproductive performance. *J Appl Rabbit Res* 1992;15:412–21.
- [11] Castellini C, Dal Bosco A, Mughal C. Comparison of different reproduction protocols for rabbit does: effect of litter size and mating interval. *Livestock Sci* 2003;83:131–9.
- [12] Jorritsma R, Wensing T, Kruip TAM, Vos PLAM, Noordhuizen JPTML. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Vet Res* 2003;34:11–26.
- [13] Kawamura A, Sato N, Fukuda J, Kodama H, Kumagai J, Tanikawa H, et al. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 2002;143:1922–31.
- [14] Craig J, Zhu H, Dyce PW, Petrik J, Li J. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2004;145:5355–63.
- [15] Leroy JLMR, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, Kruif A, et al. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 2005;130:485–95.
- [16] Harris SE, Gopichandran N, Picton HM, Leese HJ, Orsi NM. Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology* 2005;64:992–1006.
- [17] Yang H, Foxcroft GR, Pettigrew JE, Johnston LJ, Shurson GC, Costa AN, Zak LJ. Impact of dietary lysine intake during lactation on follicular development and oocyte maturation after weaning in primiparous sows. *J Anim Sci* 2000;78:993–1000.
- [18] Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update* 2003;9:35–48.
- [19] Hong J, Lee E. Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development. *Theriogenology* 2007;68:728–35.
- [20] Ubilla E, Rebollar PG, Pazo D, Esquifino A, Alvariño JM. Effects of doe litter separation on endocrinological and productivity variables in lactating rabbits. *Livestock Sci* 2000;67:67–74.
- [21] Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. Extrahypothalamic prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Rev* 1996;17:639–69.
- [22] McNeilly AS, Glasier A, Jonassen J, Howie PW. Evidence for direct inhibition of ovarian function by prolactin. *J Reprod Fertil* 1982;65:559–69.
- [23] Kermabon AY, Belair L, Theau-Clément M, Salesse R, Djiane J. Effects of anoestrus and bromocryptine treatment on the expression of prolactin and LH receptors in the rabbit ovary during lactation. *J Reprod Fertil* 1994;102:131–8.
- [24] Picazo RA, García Ruiz JP, Santiago Moreno J, González de Bulnes A, Muñoz J, Silván G, et al. Cellular localization and changes in expression of prolactin receptor isoforms in sheep ovary throughout the estrous cycle. *Reproduction* 2004;128: 545–53.
- [25] Yoshimura Y, Hosoi Y, Irritan A, Nakamura Y, Atlas SJ, Wallach EE. Developmental potential of rabbit oocyte matured in vitro: the possible contribution of prolactin. *Biol Reprod* 1989;41:26–33.

- [26] Schramm RD, Bavister BD. Effects of gonadotrophins, growth hormone and prolactin on developmental competence of domestic cat oocytes matured in vitro. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:1061–6.
- [27] Torner H, Kubelka M, Heleil B, Tomek W, Aim H, Kuzmina T, Guiard V. Dynamics of meiosis and protein kinase activities in bovine oocytes correlated to prolactin treatment and follicle size. *Theriogenology* 2001;55:885–99.
- [28] Ferguson EM, Ashworth CJ, Edwards SA, Hawkins N, Hepburn N, Hunter MG. Effect of different nutritional regimens before ovulation on plasma concentrations of metabolic and reproductive hormones and oocyte maturation in gilts. *Reproduction* 2003;126:61–71.
- [29] ÓCallaghan D, Yaakub H, Hyttel P, Spicer LJ, Boland MP. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J Reprod Fertil* 2000;118:303–13.
- [30] Boletín Oficial del Estado (BOE). Real Decreto 1201/2005. Sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. B.O.E. 2005; 252:34367–34391.
- [31] Alvaríño JMR, Del Arco JA, Bueno A. Effect of mother–litter separation on reproductive performance of lactating rabbit females inseminated on day 4 or 11 post partum. *World Rabbit Sci* 1998;6:191–4.
- [32] Pereda N, Rebollar PG, Schwarz BF, Arias-Álvarez M, Revuelta L, Lorenzo PL, Nicodemus N. Estudio de la composición corporal de conejas reproductoras mediante la técnica de Impedancia Bioeléctrica (BIA). In: Parte II: Ecuaciones de Predicción. II Congreso Ibérico de Cunicultura Vila Real; 2007.p. 17–20.
- [33] Breccia G, Bonanno A, Galeati G, Federici G, Maranesi M, Gobetti A, et al. Hormonal and metabolic adaptation to fasting: effects on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. *Domest Anim Endocrinol* 2006;31:105–22.
- [34] Tietz NW. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd Edition, WB Saunders; 1995, 518–519.
- [35] Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Lorenzo PL. Desarrollo folicular en la coneja ITEA 2007;103:1–13.
- [36] Rebollar PG, Bonanno A, Di Grigoli A, Tornambè G, Lorenzo PL. Endocrine and ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit does. *Anim Reprod Sci* 2008;104:316–28.
- [37] Kasuya K. The process of apoptosis in follicular epithelial cells in the rabbit ovary, with special reference to involvement by macrophages. *Arch Histol Cytol* 1995;58:257–64.
- [38] García-García RM, Arias-Álvarez M, Revuelta L, García-Palencia P, Sánchez Maldonado B, Rebollar PG, Lorenzo PL. Localización del receptor de prolactina en el ovario de conejas en distintos estados fisiológicos. II Jornadas Ibéricas sobre Cunicultura ASESCU. Asociación Española de Cunicultura, 2007, pp. 41–46.
- [39] Lorenzo PL, Illera JC, Silvan G, Munro CJ, Illera MJ, Illera M. Steroid-level response to insulin-like growth factor-1 in oocytes matured in vitro. *J Reprod Immunol* 1997;35:11–29.
- [40] Arias-Álvarez M, López-Béjar M, Rebollar PG, García-García RM, Lorenzo PL. Nuclear and cytoplasmic patterns of rabbit IVM oocytes ITEA 2007;28:42–4.
- [41] Castellini C, Dal Bosco A, Cardinali R. Long term effect of post-weaning rhythm on the body fat and performance of rabbit does. *Reprod Nutr Dev* 2006;46:195–204.
- [42] Cervera C, Fernández-Carmona J, Viudes P, Blas E. Effect of remating interval and diet on the performance of female rabbit and their litters. *Anim Prod* 1993;56:399–405.
- [43] Rebollar PG, Pérez-Cabal MA, Pereda N, Lorenzo PL, Arias-Álvarez M, García-Rebollar P. Effects of parity order and reproductive management on the efficiency of rabbit productive systems. *Livestock Sci* 2009;123:107–15.
- [44] Feugier A, Fortun-Lamothe L. Extensive reproductive rhythm and early weaning improve body condition and fertility of rabbit does. *Anim Res* 2006;55:454–70.
- [45] Cardinali R, Dal Bosco A, Bonanno A, Di Grigoli A, Rebollar PG, Lorenzo PL, Castellini C. Connection between body condition score, chemical characteristics of body and reproductive traits of rabbit does. *Livestock Sci* 2008;116:209–15.
- [46] Ubilla E, Rebollar PG, Pazo D, Esquifino AI, Alvaríño JM. Pituitary and ovarian response to transient doe–litter separation in nursing rabbits. *J Reprod Fertil* 2000;118:361–6.
- [47] Wallach EE, Noriega C. Effects of local steroids on follicular development and atresia in the rabbit. *Fertil Steril* 1970;21:253–67.
- [48] Rebollar PG, Ubilla E, Alvaríño JM, Illera JC, Silván G. Effect of the level of sexual receptivity on plasma oestradiol and the ovulatory response during the postpartum period in the rabbit. *Revista Española de Fisiología* 1992;48:13–7.
- [49] García-García RM, Arias-Álvarez M, Rebollar PG, Revuelta L, Lorenzo PL. Influence of different reproductive rhythms on serum estradiol, testosterone levels, features of follicular population and atresia rate, and oocyte maturation in controlled suckling rabbits. *Anim Reprod Sci* (in press).
- [50] Tsutsumi Y, Takeda T, Suzuki H, Iwasaki Y, Inada K, Minami T. Peripheral serum levels of progesterone and prostaglandin F2 α during egg transport in superovulated rabbits. *Jpn J Anim Reprod* 1980;26:15–33.
- [51] Boiti C, Canali C, Monaci M, Stradaoli G, Verini Supplizi A, Vacca C, et al. Effect of postpartum progesterone levels on receptivity, ovarian response, embryo quality and development in rabbits. In: Lebas F, editor. *Proceedings of the 6th World Rabbit Congress*, Toulouse, France; 1996. p. 45–9.
- [52] Vanholder T, Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G, Maes D, Coryn M, de Kruif A. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vivo. *Anim Reprod Sci* 2005;87:33–44.
- [53] Young VR. Diet as a modulator of aging and longevity. *Fed Proc* 1979;38(6):1994–2000.
- [54] Fouladi-Nashta AA, Gutierrez CG, Gong JG, Garnsworthy PC, Webb R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. *Biol Reprod* 2007;77:9–17.
- [55] Fortun L, Bolet G, Lebas F. Influence of prolactin on foetal survival in rabbit does. *Anim Reprod Sci* 1994;66:263–9.
- [56] Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M. Leptin expression in ruminants: Nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest Anim Endocrinol* 2005;29:3–22.
- [57] Van tol HTA, Van Eerdenburg F, Colenbrander B, Roelen BAJ. Enhancement of bovine oocyte maturation by leptin is accompanied by an upregulation in mRNA expression of leptin receptor isoforms in cumulus cells. *Mol Reprod Dev* 2008;75:578–87.
- [58] Kim HS, Lee GS, Kim JH, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Expression of leptin ligand and receptor and effect of exogenous leptin supplement on in vitro development of porcine embryos. *Theriogenology* 2006;65:831–44.
- [59] Zerani M, Boiti C, Zampini D, Breccia G, Dall’Aglio C, Ceccarelli P, Gobetti A. Ob receptor in rabbit ovary and leptin in vitro regulation of corpora lutea. *J Endocrinol* 2004;183:279–88.
- [60] Zerani M, Boiti C, Dall’Aglio C, Pascucci L, Maranesi M, Breccia G, et al. Leptin receptor expression and in vitro leptin

- actions on prostaglandin release and nitric oxide synthase activity in the rabbit oviduct. *J Endocrinol* 2005;185:319–25.
- [61] Almog B, Gold R, Tajima K, Dantes A, Salim K, Rubinstein M, et al. Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 25:179–91.
- [62] Hamm ML, Bhat GK, Thompson WE, Mann DR. Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. *Biol Reprod* 2004;71:66–72.
- [63] Maillet G, Bréard E, Benhaïm A, Leymarie P, Féral C. Hormonal regulation of apoptosis in rabbit granulosa cells in vitro: evaluation by flow cytometric detection of plasma membrane phosphatidylserine externalization. *Reproduction* 2002;123:243–51.
- [64] Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK. Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell Tissue Res* 2006;326:809–22.
- [65] Feng WG, Sui HS, Han ZB, Chang ZL, Zhou P, Liu DJ, et al. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology* 2007;67:1339–50.
- [66] Edwards RG. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 1965;208:349–51.
- [67] Yanagimachi R. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JD, editors. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press; 1994. p. 189–279.
- [68] Schroeder AC, Eppig JJ. Developmental capacity of mouse oocytes that undergo maturation in vitro: effect of the hormonal state of the oocyte donor. *Gamete Res* 1989;4:81–92.
- [69] Sirard MA. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology* 2001;55:1241–54.
- [70] Lopes AS, Martinussen T, Greve, Callesen H. Effect of days post-partum, breed and ovum pick up scheme on bovine oocyte recovery and embryo development. *Reprod Domest Anim* 2006; 41:196–203.
- [71] Roth Z, Inbar G, Arav A. Comparison of oocyte developmental competence and follicular steroid content of nulliparous heifers and cows at different stages of lactation. *Theriogenology* 2008; 69:932–9.
- [72] Dominguez MM. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology* 1995;43:1405–18.
- [73] Snijders SEM, Dillon P, ÓCallaghan DO, Boland P. Effect of genetic merit, milk yield, body conditions and lactation number of in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology* 2000;53:981–9.
- [74] Lozano JM, Lonergan P, Boland MP, ÓCallaghan D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction* 2003;125:543–53.

*CAPÍTULO 2: INFLUENCIA DE UN TIPO DE ESTRATEGIA
NUTRICIONAL DURANTE LA RECRÍA SOBRE LA FISIOLOGÍA
OVÁRICA DE LAS CONEJAS NULÍPARAS Y PRIMÍPARAS EN EL
MOMENTO DE LA INSEMINACIÓN ARTIFICIAL*

EXPERIMENTO 2a. Estudio del efecto del sistema de alimentación durante la recría mediante la administración de un pienso fibroso, con alto contenido en lignina, sobre la composición corporal, el estatus ovárico y el desarrollo embrionario temprano preimplantacional en conejas nulíparas en el momento de su primera inseminación.

Effects of a lignin-rich fibre diet on productive, reproductive and endocrine parameters in nulliparous rabbit does

4.3.1. Resumen

Las modificaciones en la dieta de las conejas en recría son fundamentales para modificar los parámetros reproductivos en las lactaciones sucesivas. En este sentido, la administración de dietas fibrosas durante la recría podría aumentar la capacidad de ingestión y el tamaño del tracto digestivo de las conejas, incrementando el consumo de alimento durante la primera lactación cuando se les administra un pienso con un mayor contenido energético. Sin embargo, los efectos sobre el estatus ovárico durante la administración de dichas pautas nutricionales y las posibles repercusiones sobre los parámetros reproductivos al primer parto no se conocen. Así pues, el objetivo del Experimento 2a fue estudiar el efecto de la administración, durante la recría, de piensos fibrosos con diferente contenido en lignina sobre la composición corporal, el estatus ovárico en el momento de su primera inseminación y el desarrollo embrionario preimplantacional temprano de las conejas núlparas (ver esquema del diseño experimental).

Las hembras que fueron alimentadas con el pienso HL (con alto contenido en lignina) aumentaron el consumo de alimento durante toda la recría. En el momento de la IA, los animales de ambos grupos nutricionales tenían pesos similares aunque las conejas que se alimentaron con el pienso HL mostraron una reducción significativa de grasa corporal y de contenido energético, así como unos niveles séricos de leptina menores. A nivel ovárico no se observaron alteraciones significativas en los parámetros medidos (peso de los ovarios, población de folículos antrales, niveles séricos de progesterona, maduración nuclear y citoplasmática *in vitro* de los oocitos y tasa de ovulación) aunque los niveles de estradiol fueron muy superiores en las conejas del grupo HL. La tasa de blastocistos y la prolificidad fueron similares en ambos grupos. Sin embargo, el porcentaje de desarrollo de los embriones viables que fueron cultivados *in vitro* y la fertilidad fue inferior en el grupo HL.

Los resultados muestran que la dieta con alto contenido en lignina genera un aumento en la capacidad de ingestión aunque las reservas energéticas y los niveles séricos de leptina están disminuidos el día de la primera IA. En ese momento estas diferencias no parecen afectar a los parámetros ováricos analizados pero sí a la supervivencia *in vitro* de embriones y a la fertilidad de las conejas alimentadas con el pienso HL.

4.3.2. Diseño experimental

El Experimento 2a se realizó con un total de 95 conejas nulíparas híbridos de Neozelandés blanco x California, los cuales fueron alimentados desde las 11 semanas de edad hasta su primer parto (20 semanas) con piensos fibrosos, suministrados *ad libitum*. Se utilizó un pienso con un contenido estándar de lignina ácido detergente (LAD) [grupo SL, 4,9% LAD sobre Materia Seca (MS), n = 47] y otro pienso experimental alternativo con un contenido alto en LAD (grupo HL, 15,8% LAD sobre MS, n = 48).

Las hembras nulíparas fueron inseminadas a las 16 semanas de edad. La capacidad de ingestión fue valorada durante todo el periodo de recría, gestación y hasta el día del parto.

El día de la IA se determinó el peso de las conejas, la composición corporal y los niveles séricos de leptina. Además, se valoraron los siguientes parámetros en un total de 20 animales:

- ❖ antes de la IA (Grupo G1): 10 hembras fueron distribuidas entre el Grupo SL (n = 5) y el Grupo HL (n = 5).
 - en estos grupos se determinaron los niveles séricos de estradiol y progesterona, el peso de los ovarios, se categorizó la población folicular y se midió el grado maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos *in vitro*.
- ❖ 3,5 días después de la IA (Grupo G2): 10 hembras fueron distribuidas entre el Grupo SL (n = 5) y el Grupo HL (n = 5).
 - en estos grupos se determinó la tasa de ovulación, la tasa de embriones obtenidos y el desarrollo embrionario *in vitro*.

En los animales restantes se determinaron los parámetros de fertilidad y la prolificidad al primer parto.

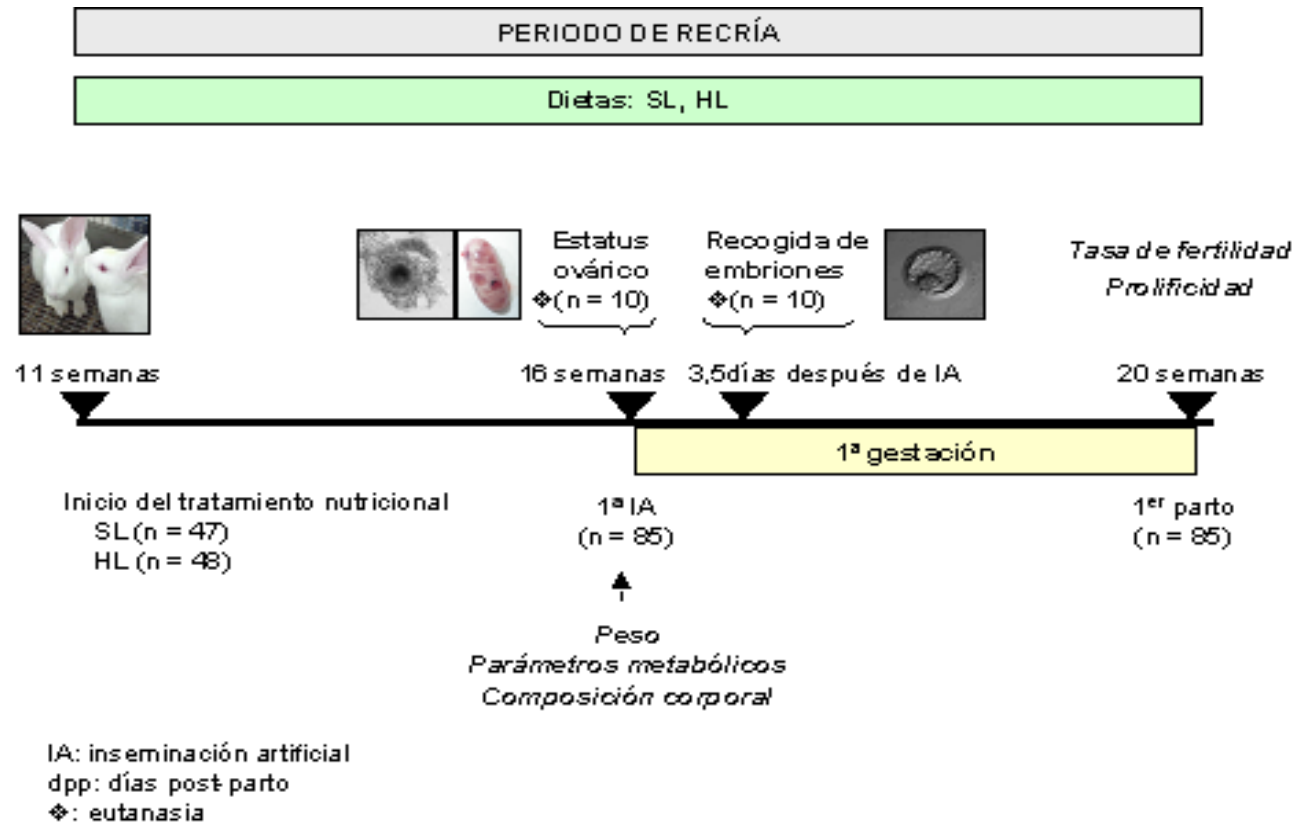
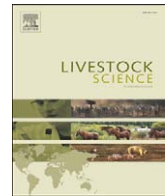


Imagen 4.3. Representación esquemática del diseño correspondiente al Experimento 2a, para determinar la composición corporal, el estatus metabólico y ovárico en el momento de la primera IA y el desarrollo embrionario preimplantacional en conejas núlparas alimentadas con piensos fibrosos con un contenido estándar de lignina (Grupo SL) o elevado (Grupo HL) durante la recría.



Effects of a lignin-rich fibre diet on productive, reproductive and endocrine parameters in nulliparous rabbit does

M. Arias-Álvarez^{a,*}, R.M. García-García^a, P.G. Rebollar^b, N. Nicodemus^b, L. Revuelta^a, P. Millán^a, P.L. Lorenzo^a

^a Department of Physiology (Animal Physiology), Complutense University of Madrid, Spain

^b Department of Animal Production, Polytechnic University of Madrid, Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2008

Revised 26 October 2008

Accepted 27 October 2008

Keywords:

Rabbit

Oocyte

Embryo

Leptin

Fibre

Lignin

ABSTRACT

In rabbits, modifications in dietary composition may be associated with reproductive benefits. However, the influence of nutrition on ovarian function and embryo development is poorly known in this species. The goal of this work was to study the short-term effects of feeding high-fibre diets with different levels of lignin during the rearing period on productive, endocrine and reproductive parameters of nulliparous rabbit does. A total of 95 New Zealand × California 11-week-old nulliparous white rabbits were randomly allocated in two experimental groups fed *ad libitum* fibre-rich diets with a high lignin content (HL group: NDF 49.6% of DM, LAD 15.8% of DM; $n = 48$) or a standard lignin content (SL group: NDF 40.9% of DM, LAD 4.9% of DM; $n = 47$). All animals were artificially inseminated (AI) at 16 weeks of age. Daily feed intake and live body weight (LBW) were recorded during the rearing period. Conception rate and prolificacy were also determined. In addition, in ten animals of each group, body composition, serum estradiol 17 β (E₂), progesterone (P₄) and leptin levels, as well as reproductive parameters including ovary weight, follicular population, ovulation rate, *in vitro* oocyte maturation (IVM), blastocyst recovery rate and *in vitro* embryo development were studied at AI time. Animals fed the HL diet had a significantly higher feed intake until the first AI ($P < 0.003$) and during the first pregnancy ($P < 0.03$). At 16 weeks of age, animals fed the HL diet had a lower content of lipids ($P < 0.05$) and crude energy ($P < 0.05$) than those fed the SL diet, but average LBW of does, ovary weight, and ovulation rate per doe were similar between HL and SL treatments. No significant differences were found in P₄ levels. However, the HL group had elevated E₂ serum levels ($P < 0.003$) compared to those fed with the SL diet, whereas antral follicular population was similar between groups. Both nuclear and cytoplasmic IVM measured as metaphase II and cortical granule migration rates were also similar between both groups. In addition, no differences in blastocyst recovery rate or in prolificacy were found. However, mean serum leptin levels ($P < 0.05$), *in vitro* embryo development ($P < 0.03$), and fertility rate ($P < 0.02$) were higher in the SL group compared to the HL group. In conclusion, the HL diet enhanced feed intake of does, but reduced serum leptin levels at AI time, *in vitro* embryo survival and conception rate.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nutritional needs in reproductive does have been widely studied. During lactation, the feed intake of females increases very quickly after kindling (60–75%). However, in primiparous

does this increase is insufficient to cover their requirements due to maintenance, growth and milk production. This causes a very negative energy balance when females are concurrently pregnant and lactating (Parigi-Bini et al., 1992) and explains the lower reproductive performance observed in these animals (Pascual et al., 1998). Several studies reported an increase in the feed intake during the first lactation when feeding the young females with a fibre-rich diet to improve their reproductive performance (Nizza et al., 1997; Xiccato

* Corresponding author. Tel.: +34 913943842; fax: +34 913943835.

E-mail address: m.arias@vet.ucm.es (M. Arias-Álvarez).

et al., 1999; Pascual et al., 2002). In addition, the type of fibre in terms of degree of lignification has been reported as a main negative factor on fibre digestion efficiency (Gidenne and Perez, 1994; García et al., 1996). However, both dietary lignin and fibre levels are major factors enhancing rate of passage and subsequent intake capacity (Van Soest, 1994). These findings enhance the interest of extending these studies to investigate the effects of high lignin content in fibrous diets in order to determine if this nutritional variation may be associated with reproductive benefits.

The effects of nutritional treatments on ovarian function and embryo survival have been reported in different species (sheep: O'Callaghan et al., 2000; Lozano et al., 2003; cow: Adamiak et al., 2006; pig: Ferguson et al., 2003, 2006, 2007) but, to our knowledge, no studies have been made in rabbit does. Findings in those species indicate that some of the effects of nutrition on reproduction may relate to oocyte maturation and preimplantation embryo development. In cattle, restricting the energy intake enhances the cleavage rate (Adamiak et al., 2006) and subsequent *in vitro* development of the oocytes (McEvoy et al., 1997) of heifers offered high-fibre diets versus those fed with high starch diets. Also, feeding a high-fibre diet during the oestrous cycle before mating has been found to alter preovulatory endocrinology (Ferguson et al., 2007), and improve oocyte maturity and increase embryo survival in gilts (Ferguson et al., 2006).

Leptin is a hormone related to the nutritional status, the proportion of body lipids and the index of body mass (Delavaud et al., 2002; Chilliard et al., 2005). It is associated with inhibition of reproduction when the level of body reserves is insufficient to trigger gestation or lactation (Moschos et al., 2002; Nicodemus et al., 2007). Brecchia et al. (2006) have described a lower mean plasma leptin concentration, a decrease of estradiol-17 β pulse, frequency and amplitude, and a lower LH peak as a consequence of acute food deprivation. Also, an influence of leptin on ovarian function, embryo development and the implantation process has been suggested (Cervero et al., 2004; González et al., 2006), since the leptin receptor (Ob-R) has been detected in granulosa cells of follicles and oocytes of rabbit ovaries and oviducts (Zerani et al., 2004).

Given that the effects of nutrition on ovarian function and embryo development in rabbit are poorly understood, the aim of this study was to analyse the short-term effect of different fibre diets, administered during the rearing period, on productive, endocrine and reproductive parameters of nulliparous rabbit does.

2. Materials and methods

Unless otherwise stated, all the chemicals were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). Experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Polytechnic University of Madrid (Spain) and were in compliance with the Spanish guidelines for the care and use of animals in research (BOE, 2005).

2.1. Experimental diets

Two high fibre diets were used to meet or exceed all the essential nutrient requirements of a mixed feed for lactating and fattening rabbits (De Blas and Mateos, 1998). A high lignin

Table 1

Ingredients and chemical composition of experimental diets (dry matter %).

	Experimental diets	
	SL	HL
Ingredients (%)		
Lucerne hay	28.0	50.0
Defatted grape seed meal	0.0	19.0
Wheat	10.0	10.0
Wheat bran	12.5	12.5
Sugarbeet pulp	14.0	0.0
Straw	22.0	0.0
Sunflower 30%	7.4	7.4
Soybean 44%	5.0	0.0
L- Threonine	<0.1	<0.1
Calcium Carbonate	0.3	0.3
Salt	0.5	0.5
Zinc Bacitracin	0.2	0.2
Corrector ⁽¹⁾	0.2	0.2
Chemical analysis (DM %)		
Dry matter	90.6	90.5
Ash	8.2	8.6
Crude protein	16.8	16.6
Starch	17.9	8.9
Acid detergent fibre	20.3	33.9
Neutro detergent fibre	40.9	49.6
Acid detergent lignin	4.9	15.8
Ether extract	3.1	3.3
Energy (MJ/Kg)	18.2	18.5
Digestible Energy (MJ/Kg)	9.3 \pm 0.1 ^a	11.3 \pm 0.1 ^b

Values are means \pm SEM. Means in rows with different letters differ ($P < 0.001$).

⁽¹⁾ Provided by DSM Nutritional Products Iberia, S.A. Mineral and vitamin composition (mg/kg of complete diet): Mn: 15; Zn: 50; I: 0.8; Fe: 40; Cu: 8; Co: 0.30; Se: 0.05; riboflavin: 3; calcium D-pantothenate: 10; nicotinic acid: 25; menadione: 1; α -tocopherol: 35; thiamine: 1; pyridoxine: 1.5; biotin: 0.05; folic acid: 1.5; cyanocobalamin: 0.012; robenidine: 50; vitamin A: 10,000 IU/kg; vitamin D3: 900 IU/kg.

(HL) diet was formulated to contain a high proportion of lignified fibre (49.6% Neutral Detergent Fibre (NDF) and 15.8% Acid Detergent Lignin (ADL) on dry matter basis, a standard lignin (SL) diet was formulated to contain a standard proportion of lignified fibre (40.9% NDF and 4.9% ADL on DM basis). The ingredients and chemical composition of the experimental diets are shown in Table 1.

2.2. Animals and experimental design

A total of ninety-five, 11-week-old nulliparous New Zealand \times California white rabbit does were used in this study. Animals were housed on the experimental farm at the Animal Production Department, Polytechnic University of Madrid (Spain), in individual flat-deck cages under a constant photoperiod of 16 h of light per day, a temperature of 18–22 °C and a relative humidity of 60–75% maintained by a forced ventilation system. Forty-eight does were randomly allocated to the HL diet and forty-seven does to the SL diet. The feeding treatments were supplied *ad libitum* during the rearing period, from 11 weeks old to first parturition.

First artificial insemination (AI) was performed at 16 weeks of age using a pool of fresh heterospermic semen with more than 20 million spermatozoa in 0.5 ml of a commercial diluent (Magapor, S.L., Spain). Ovulation was induced by intramuscular injection of 1 μ g buserelin (Suprafact,

Hoechst Marion Roussel, S.A., Madrid). Live body weight (LBW) was recorded at 11 and 16 weeks old. Also, daily feed intake until first AI and during pregnancy was determined. Conception rate (number of parturitions per number of inseminations $\times 100$) and prolificacy (live and dead born) were also recorded.

At AI time, twenty animals (HL group, $n=10$, and SL group, $n=10$) were randomly chosen to determine body composition by means of Bioelectrical Impedance (BIA). In the same animals, blood samples were collected to determine endocrine parameters. In each experimental group, five animals were euthanized before AI (G1 group, follicular phase), and the other five 3.5 days after AI (G2 group, luteal phase). Ovarian parameters (ovary weight, follicular population categorization, meiotic and cytoplasmatic *in vitro* oocyte maturation) were recorded in the G1 groups, whereas ovulation rate and embryo parameters (recovery rate and *in vitro* embryo development) were noted in the G2 groups.

2.3. Analytical methods

Chemical analysis of diets was done using the method of Van Soest et al. (1991) and Mertens (2002) for NDF, and the official method (973.18) of the Association of Official Analytical Chemists International (2000) for acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL). Neutral detergent fibre, ADF and ADL were extracted successively using the filter bag system (Ankom Technology, New York) and corrected by ash content of ADL residue. Procedures of the AOAC International (2000) were also used for dry matter (DM; oven drying method: 930.15), ash (muffle furnace incineration: 923.03) and crude protein (CP; Dumas method: 968.06; FP-528 LECO, St. Joseph, MI, USA). Gross energy was determined in an adiabatic calorimeter. Digestible energy (DE) was determined in a fecal digestibility trial according to the method of Pérez et al. (1995) using eight animals per diet.

Bioelectrical impedance was measured with a four-terminal body composition analyser (Model Quantum II, RJL Systems, Detroit, MI). It was used to determine resistance (R_s , in ohms) and reactance (X_c , in ohms) according to the method used by Swantek et al. (1992) with pigs. Impedance needles (21 G \times 1 1/2", 0.8 \times 40 mm) were used as electrodes. Multiple regression equations described by Pereda et al. (2007) were used for estimating water, protein, ash, fat and energy content (g) in relation to live body weight.

2.4. Blood sampling and hormone assay

Blood samples were collected from the marginal ear vein into non-heparinized tubes before AI (G1 group) to measure serum estradiol 17 β and leptin levels, and 3.5 days after AI (G2 group) to determine serum progesterone concentrations. Serum was obtained after centrifugation at 1200 g for 10 min at 4 °C and stored at -32 °C until analysed.

Serum leptin level was determined in duplicate samples using a Multi-species Leptin RIA Kit (LINCO Research, Missouri, USA) previously used in rabbits (Corino et al., 2002; Depoortere et al., 2004; Brecchia et al., 2006). Intra and inter-assay coefficients of variation were 3.1% and 7.3%, respectively. The limit of detection after adjusting the standard curve to rabbit values was 0.1 ng/ml HE (Human Equivalent).

Serum estradiol 17 β (E_2) and progesterone (P_4) levels were measured in duplicate samples by specific chemiluminescence methods (CMIA, Abbot Laboratories, Abbot Park IL, USA), using purified monoclonal antiestradiol and polyclonal antiprogesterone rabbit antibodies. The intra- and inter-assay variation coefficients were 6.6% and 7% for E_2 , and 6.3% and 5.8% for P_4 . The detection limit of the E_2 was 10 pg/ml, and 0.2 ng/ml for P_4 .

2.5. Follicular population study

Ovaries were recovered by laparotomy using one of them for histological studies and the other one for *in vitro* maturation assessment. Ovary weight, number of follicles ≥ 1 mm on the ovarian surface and ovulation rate were first recorded. Then, the ovaries were excised and cut into two halves were placed into a 4%-buffered neutral paraformaldehyde solution (pH 7.2–7.4). All samples were gradually dehydrated with increasing concentrations of ethyl alcohol (50–100%). These dehydrated specimens were first embedded in paraffin, prepared by sectioning at 5 μ m, and stained with hematoxylin/eosin. In order to study follicle population, a pair of histological sections of each half ovary were examined at light microscope (Olympus BX40, Hamburg, Germany). Rabbit ovarian follicles were categorized into four specific development stages related to the number of layers of granulosa cells according to Arias-Álvarez et al. (2007a) and Rebollar et al. (2008), namely, primordial, primary, secondary and antral follicles.

2.6. Oocyte collection and *in vitro* maturation

The remaining ovaries were placed in PBS at 37 °C and transported to the laboratory. Cumulus-oocyte complexes (COC) were obtained from ovarian follicles ≥ 1 mm by aspiration with a 25 gauge needle under a stereoscopic microscope. COC (HL group, $n=52$, and SL group, $n=70$) with compact cumulus cells were washed and placed in 500 μ l of maturation medium in four-well dishes and cultured for 16 h at 38 °C under an atmosphere of 5% CO₂ in air with maximum humidity. The maturation medium consisted of Tissue Culture Medium (TCM-199) with 2 mM L-glutamine, 0.1 mg/ml sodium pyruvate supplemented with 10% Foetal Calf Serum (FCS), 10 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) and 100 ng/ml Insuline Growth Factor (IGF) according to Lorenzo et al. (1997).

2.7. Confocal microscopy study

After the maturation period, a total of 113 COC (HL group, $n=47$; SL group, $n=66$) were treated for the confocal study. First, cumulus cells were removed with 2 mM hyaluronidase by gentle pipeting. Then, oocytes were treated with 0.5% pronase to digest the zone pellucidae, fixed in PBS containing 4%-buffered neutral paraformaldehyde solution (pH 7.2–7.4) and stored in PBS. Oocytes were washed with permeabilising solution (0.02% Triton X-100) and treated for 40 min with blocking solution [7.5% Bovine Serum Albumin (BSA)]. They were then incubated for 30 min at room temperature with 100 μ g/ml fluorescein isothiocyanate of *lens culinaris* (FITC-LCA) for cortical granule (CG) staining and 15 min at 39 °C with 10 μ g/ml Propidium Iodide for nuclear staining. After that, oocytes were

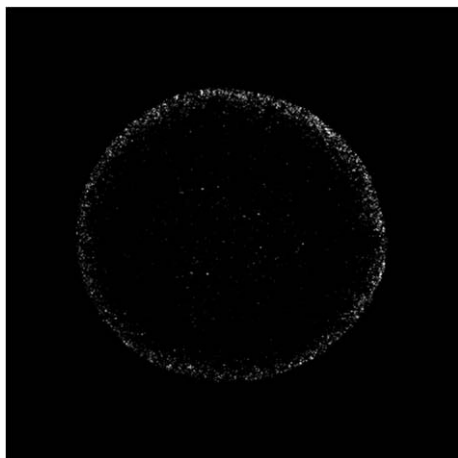


Fig. 1. Cytoplasmic maturation measured as peripheral distribution of CG with a confocal laser-scanning microscope of *in vitro*-matured oocytes from rabbit does at AI time (16 weeks old).

mounted between a coverslip and a glass slide supported by columns of paraffin and examined under a confocal laser-scanning microscope (Leica, TCS SP5) (Fig. 1). According to previous work (Arias-Álvarez et al., 2007b), CG distribution was classified as follows: 1) Homogeneous: CG were distributed throughout the cytoplasm, as they did not show cytoplasmic maturation; 2) Cortical: most of the CG were distributed at the cortical area; 3) Peripheral: CG were distributed adjacent to the plasma membrane forming a monolayer, since they were cytoplasmically mature (Fig. 1).

2.8. Embryo recovery and *in vitro* culture

A total of 76 embryos (HL group, $n = 36$; SL group, $n = 38$) were recovered 3.5 days after AI by flushing the reproductive tract with PBS + 0.1% BSA. Embryos of each animal were placed in 500 μ l four-well dishes with TCM-199 medium and 10% FCS. The plates were incubated for 72 h in an atmosphere of 5% CO₂ at 38 °C. Embryos were classified on the basis of conventional morphological criteria and according to their stage of development following the guidelines of the International Embryo Transfer Society.

2.9. Statistical analysis

Trial data were analysed as a completely randomized design with the experimental diet as the main source of variation by using the GLM procedure of Statistical Analysis Systems Institute Inc. (2001) and SPSS software (SPSS 13.0, Inc, Chicago, IL). Means between experimental groups were compared using a protected *t*-student test. Chi-square test was carried out to analyse fertility, blastocyst recovery rate, *in vitro* embryo development rate and to compare the nuclear maturation and CG migration index.

3. Results

3.1. LBW, feed intake, body composition and reproductive parameters

Doe LBW, feed intake and reproductive parameters recorded during the rearing period are shown in Table 2, and estimated

Table 2

Productive parameters in rabbit nulliparous does fed with different diets (HL and SL) during rearing period.

	Experimental Diet	
	SL	HL
No. of does	47	48
Live body weight (g)		
Start, 11 weeks old	2274.0 \pm 39.5	2296.0 \pm 38.9
First AI, 16 weeks old	3600.0 \pm 42.8	3580.0 \pm 42.2
Feed intake (g/day)		
Start–first AI	189.0 \pm 8.5 ^a	214.0 \pm 7.6 ^b
Pregnancy	156.0 \pm 11.6 ^a	243.0 \pm 11.4 ^b
Conception rate (%)	90.6 \pm 2.9 ^a	83.4 \pm 2.8 ^b
Prolificacy (n)		
Live born	9.5 \pm 0.5	9.2 \pm 0.5
Dead born	0.9 \pm 0.3	0.7 \pm 0.3

Values are means \pm SEM. Means in rows with different letters differ ($P < 0.05$).

body composition in Table 3. Nulliparous does of both experimental groups reached similar LBW at the time of their first AI. However, does receiving HL diet showed a significantly higher feed intake until first AI ($P < 0.05$) and during first pregnancy ($P < 0.05$) than those fed SL diet. Regarding body composition, animals fed HL diet had a lower content of lipids ($P < 0.05$) and crude energy ($P < 0.05$) than does fed SL diet. DE in

Table 3

Effect of experimental diets on estimated body composition, endocrine and ovarian parameters, and post-fertilization development in nulliparous does at 16 weeks of age.

	Experimental diet	
	SL	HL
No. of does	10	10
Body composition ⁽¹⁾		
Water (g)	2177.0 \pm 22.8	2165.0 \pm 22.4
Ash (g)	112.0 \pm 1.3	110.7 \pm 1.3
Proteins (g)	643.5 \pm 7.2	628.5 \pm 7.1
Lipids (g)	537.6 \pm 17.6 ^a	488.0 \pm 17.3 ^b
Energy (MJ)	40.3 \pm 0.9 ^a	37.8 \pm 0.9 ^b
Endocrine profiles		
Leptin (ng/ml)	5.4 \pm 0.4 ^a	4.5 \pm 0.3 ^b
Estradiol 17 β (pg/ml)	24.4 \pm 1.6 ^a	91.3 \pm 18.1 ^b
Progesterone (ng/ml)	6.7 \pm 0.7	5.1 \pm 1.2
Ovarian parameters		
Ovary weight (g)	218.1 \pm 14.0	182.1 \pm 17.1
Ovulation rate per doe	16.6 \pm 1.3	14.4 \pm 2.6
Follicular population		
Preovulatory follicles per ovary	5.8 \pm 0.7	7.3 \pm 0.9
Antral follicles	13.4 \pm 2.7	13.0 \pm 3.7
Secondary follicles	13.0 \pm 0.7 ^a	7.0 \pm 2.3 ^b
Primary follicles	26.8 \pm 7.5	18.8 \pm 7.0
Primordial follicles	102.0 \pm 24.7	145.0 \pm 48.4
Oocyte maturation		
n	66	47
MI rate (%)	59.3 \pm 9.6	67.5 \pm 7.5
CG migration rate (%)		
Peripheral distribution (%)	39.2 \pm 8.7	26.1 \pm 6.8
Cortical distribution (%)	28.6 \pm 8.6	31.0 \pm 7.2
Homogeneous distribution (%)	32.1 \pm 9.1	42.9 \pm 7.7
Embryo parameters		
n	38	36
Embryos recovered per doe (n)	7.6 \pm 0.6	7.2 \pm 0.9
Blastocysts recovery rate (%)	71.0 \pm 7.4	80.5 \pm 6.6
<i>In vitro</i> embryo development (%)	92.3 \pm 2.9 ^a	72.2 \pm 21.8 ^b

Values are means \pm SEM. Means in rows with different letters differ ($P < 0.05$).

⁽¹⁾ Body composition was estimated using multiple regression equations as described by Pereda et al. (2007).

the diet was lower in the HL group than the SL group ($P<0.001$). There were no significant differences between treatments in prolificacy, but conception rate showed better results in SL group compared to HL group ($P<0.02$).

3.2. Hormone assay

Comparisons of hormone concentrations (Table 3) from all does studied at the time of their first insemination (16 weeks old) revealed a significant effect of the diet on serum leptin concentrations ($P<0.05$). Serum leptin levels in the SL group were significantly higher than in the HL group ($P<0.05$). E_2 serum levels were significantly higher in HL than in SL does (91.3 ± 18.1 vs. 24.4 ± 1.6 ; $P<0.003$) in the G1 group. Average P_4 serum levels were not significantly different in the G2 group (5.1 ± 1.2 vs. 6.7 ± 0.7).

3.3. Ovarian parameters

As depicted in Table 3, average ovary weight, mean of total preovulatory ≥ 1 mm follicles in the ovarian surface per ovary,

and ovulation rate per doe were similar between nutritional groups. Follicular population was not affected by the nutritional treatment, since no significant differences were found in the means of primordial, primary and antral follicles between treatments. However, the average number of total secondary follicles was less in the HL group than in the SL group ($P<0.05$).

3.4. Oocyte *in vitro* maturation, embryo recovery rate and *in vitro* embryo development

No significant differences were found in nuclear or cytoplasmic *in vitro* maturation measured as metaphase II and CG peripheral migration rate (Table 3; Fig. 1). However, CG migration rate was slightly higher in the SL group compared to the HL group ($39.2 \pm 8.7\%$ vs. 26.1 ± 6.8 , respectively). In addition, no differences in blastocyst recovery rate were found between groups, whereas *in vitro* embryo development (measured as number of developed blastocysts recorded at 72 h of culture) was significantly higher in the SL group (72.2 vs. 92.3%; $P<0.03$) (Table 3; Fig. 2).

4. Discussion

Fibre is one of the main constituents of commercial diets for intensively reared rabbits (De Blas et al., 1999). The fibre level in the diet is usually higher in rabbits than in other non-ruminant species, because passage of digesta is faster and extension of fibre digestion is lower. In contrast, low fibre contents are associated with digestive disorders (De Blas et al., 1986; Parigi-Bini et al., 1994). Both the type of fibre and the degree of lignification (ADL) in diets are important and have been reported as major negative influences on fibre digestion efficiency (Gidenne and Perez, 1994; García et al., 1996). However, a minimal ADL concentration (around 5%) is needed to maximise feed intake, daily gain and performance of lactating does (Nicodemus et al., 1999). Moreover, young rabbits need a higher level of fibre in their diet; probably because they show a poorer efficiency of fibre digestion than adult animals (De Blas et al., 1995). In this way, the fibre level and lignin content of the SL diet used in this study were similar to a commercial diet (Pascual et al., 2002) and to that used in previous works (Nizza et al., 1997; Xiccato et al., 1999; Pascual et al., 2002). These authors obtained higher or similar values in the reproductive performance to groups with lower level of fibre in the diet, confirming the efficiency of the administration, during the growing period, of a diet rich in fibre. In this sense, our results for conception and prolificacy rates are also in accordance with the above mentioned studies. However, we have investigated for the first time in rabbits the links between nutrition (including highly lignified by-products in commercial feeds) and ovarian function (including factors as oocyte quality and embryo development).

Body maturity in does is related to protein/lipid composition and LBW at first AI, and can also be influenced by feed intake (Rommers et al., 2004). In the present study, in spite of the higher feed intake of the HL group during the experimental period, nutritional treatment did not affect LBW of does. Nevertheless, body composition showed some differences, especially in estimated lipids and energy content. These results are in agreement with those reported by other

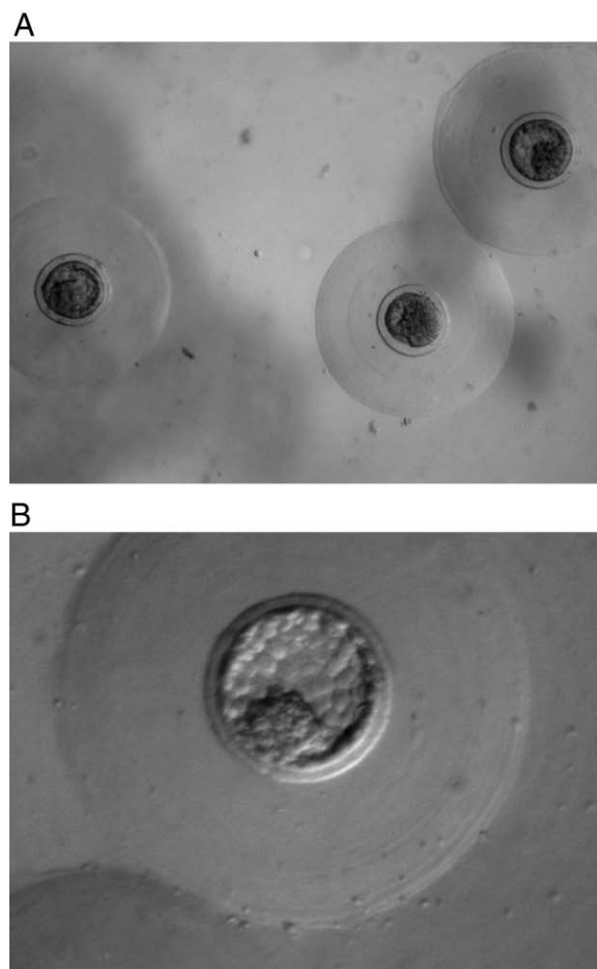


Fig. 2. Rabbit blastocysts covered with mucin layer obtained at 3.5 days post insemination from animals under different fibrous nutritional treatments. A) 4 \times ; B) 10 \times .

authors (De Blas et al., 1986; Nizza et al., 1997; Xiccato et al., 1999; Nicodemus et al., 1999; Pascual et al., 2002). They attribute the higher feed intake observed with lignified diets to a decrease in feed digestibility associated to a faster passage rate of digesta through the digestive tract. Therefore, a HL diet supplied during rearing could improve the intake capacity of primiparous does even during lactation when a more concentrated feed will be furnished. Although body composition was different, mean LBW of does at 16 weeks was homogenous (around 3600 g), which is appropriate for AI (approximately 80% of their adult weight) to achieve good reproductive results (Rommers et al., 2002). Consequently, in the present study, AI took place at 16 weeks for both groups, as in Bonanno et al. (2004), whereas in similar nutritional conditions insemination is usually retarded to 18–20 weeks (Xiccato et al., 1999; Pascual et al., 2002; Castellini et al., 2006). Although the HL diet increased the feed intake during pregnancy, it did not improve the conception rate as in the SL group. Nevertheless, the values are similar to those normally obtained in rabbit farms for nulliparous does (Nizza et al., 1997; Castellini et al., 1998; Xiccato et al., 1999; Pascual et al., 2002; Castellini et al., 2006). Further studies are needed to evaluate if the reduction in conception rate of the HL group could be balanced with a higher feed intake and expected better body condition in primiparous does, improving their reproductive performance.

Some of the effects of nutrition on reproduction are linked to factors like leptin, a hormone secreted by adipocytes and other tissues (Zhang et al., 1994; Thorn et al., 2007). Leptin is involved in the metabolism and in the neuroendocrine signalling, thus reflecting the body maturity level (Considine and Caro, 1997; Fortun-Lamothe, 2006). Reaching the permissive leptin threshold should be necessary for pubertal reproductive activity, and may be associated with inhibition of reproduction when the level of body reserves is insufficient to trigger gestation or lactation (Cheung et al., 1997; Moschos et al., 2002). In this sense, leptin levels achieved in this experiment at first AI were higher than concentrations recently reported in prepubertal does (Nicodemus et al., 2007), and may reflect the minimum LBW (80% of the adult one) leading to optimum reproductive performance. On the other hand, serum leptin levels are correlated with the degree of adiposity (Keim et al., 1998) and regulated by feeding and fasting (Zhang et al., 1994; Delavaud et al., 2002). Ferguson et al. (2003) and Brecchia et al. (2006) established a relationship between the level of feed intake and fasting and mean plasma leptin concentrations. Higher serum leptin concentrations suppress appetite (Foster and Nagatani, 1999) and feed intake (Rommers et al., 2004). Therefore, in our study, the increase of serum leptin levels in the does of the SL group could be related not only to the higher body lipid and energy contents but also to the difference in feed intake, and may even be involved in the higher fertility rate of this group. In contrast with our observations, Adamiak et al. (2006) and Ferguson et al. (2006) showed that serum leptin levels were not significantly influenced by dietary composition or feed intake in cattle and gilts. These conflicting results may reflect the differences among species and experimental conditions, such as the time of feeding or the type of diet used.

Altered nutritional regimens prior to mating can influence ovarian function, including follicle and oocyte characteristics

(Quesnel et al., 1998; Yang et al., 2000; Ferguson et al., 2007). Measurements of E_2 levels have been commonly used to assess antral follicular growth and their steroidogenic capacity (Wallach and Noriega, 1970; Lefèvre and Caillol, 1978; Rebollar et al., 1992; Kermabon et al., 1994). Thus the decrease in E_2 levels in the SL group could indicate a lower follicular development with a lower ability of follicles to support oocyte maturation (Yang et al., 2000). However, in this study, follicular development and oocyte maturation showed similar rates in both groups. Other authors reported that higher E_2 levels exert an inhibitory effect on the pulsatile release of GnRH in rabbits and on the pulse of pituitary LH and FSH (Younglai, 1978; Pau and Spies, 1986). The inhibitory effect of E_2 on the LH pulse is also shown in other species, including rats (Blake, 1974), sheep (Diekman and Malven, 1973), and monkeys (Yamaji et al., 1972). Thus, a decreased concentration of circulating steroids may be one of the hormonal mechanisms responsible for improved oocyte quality (Ferguson et al., 2007). In spontaneously-ovulating species, the preovulatory E_2 surge reflects the optimal condition of preovulatory follicles and oestrous behaviour; however, the plasma E_2 concentration does not exactly predict the sexual receptivity in rabbit does (Rebollar et al., 1992). Therefore, rabbits may use other ovarian mechanisms, such as paracrine or autocrine factors (Tonetta and diZerega, 1989; Lorenzo et al., 1994, 1997) to maintain an optimal environment in order to ensure adequate oocyte maturation (Pau et al., 2000).

Leptin could also act as a modulator of oocyte quality (Kawamura et al., 2002; Craig et al., 2004; Paula-Lopes et al., 2007; Arias-Álvarez et al., 2008). This process implies synchronization of nuclear and cytoplasmic events (Yanagimachi, 1994), which are essential to promote the proper development to the blastocyst stage (Plachot and Crozet, 1992; Yang et al., 1998). Although nuclear status of the oocyte has been used as an indicator of its maturation stage (Edwards, 1965; Jelinkova et al., 1994; Sirard et al., 2006) in mammalian oocytes, cortical granule (CG) migration has been used as a criterion for the assessment of cytoplasmic maturation. This is because CG positioned just beneath the plasma membrane are essential in the prevention of polyspermic fertilisation (Schmell et al., 1983). Ferguson et al. (2007) reported that feeding a high fibre diet (50%) before mating significantly improves *in vitro* nuclear oocyte maturity in gilts. In this study, oocyte maturation rate was similar in both fibrous nutritional groups, even though oocyte quality (measured as cytoplasmic maturation rate) was slightly higher in the SL group. Other studies with animals subjected to different nutritional treatments show no differences either in ultrastructural oocyte morphology (O'Callaghan et al., 2000) or in oocyte quality (Rizos et al., 2008). On the contrary, in pigs, high intake of a maintenance diet enhanced oocyte meiotic maturation *in vitro* and serum leptin levels, providing evidence of a link between dietary intake and oocyte maturity (Ferguson et al., 2003).

Finally, oocytes are the main factor affecting blastocyst yield (Lonergan et al., 2006) so the diet consumed before mating could have an impact on embryo survival (Ashworth et al., 1999; Lozano et al., 2003), especially high-fibre diets (Adamiak et al., 2006; Ferguson et al., 2006, 2007). Some experiments have shown that undernutrition has a negative

effect on foetal development (Borwick et al., 1997; Lozano et al., 2003), delaying embryo development (Abecia et al., 1997) and increasing embryo mortality during the first two weeks after fertilization (Rhind et al., 1989). Our results showed higher prolificacy than that obtained by other authors in similar experimental conditions (Bonanno et al., 2004). During the luteal phase, P₄ is the main hormone suggesting pregnancy (Holt and Ewing, 1974; Robinson et al., 2008). In this study, P₄ levels and blastocyst recovery rate at 3.5 days post AI were similar between nutritional groups. Together with P₄, leptin may play an important role in mediating the effect of nutrition on embryo survival (Lozano et al., 2003), including the implantation process (Cervero et al., 2004; González et al., 2006). In this sense, leptin and blastocyst *in vitro* development was higher in SL does, in accordance with the conception rate obtained. Besides, other factors related to metabolic status could also exert an influence in the ovarian follicle or in further postovulatory events. Thus, the mechanisms underlying these important changes related to the fibre contents in diet clearly warrant further studies in rabbit does.

In conclusion, the present work shows effects of diets containing different lignin contents supplied *ad libitum* during the rearing period on ovarian and embryo features in rabbit does. Fibre-rich diets allow for insemination of does at 16 weeks. HL diets enhance feed intake although such diets reduce serum leptin levels at AI time, *in vitro* embryo survival, and as a consequence, conception rate. Nevertheless, some controversial observations imply that more long-term research is required to better understand the role of nutrition in the development of oocytes and embryos in rabbits. This will allow selecting adequate management systems to improve the reproductive parameters and economic benefits in rabbit does subjected to high production rhythms.

Acknowledgements

This work was supported by MEC project AGL05-196, UCM PR1/07-14906 and UCM-CM research program (920249-2007). MAA has been granted by CM and FSE, and RMGG was supported by the “Juan de la Cierva” MEC Program. The authors wish to thank Marta Cuadrado and Nelly Pereda for their invaluable support in the experimental part of this work.

References

- Abecia, J.A., Lozano, J.M., Forcada, F., Zarazaga, L., 1997. Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 48, 209–218.
- Adamiak, S.J., Powell, K., Rooke, J.A., Webb, R., Sinclair, K.D., 2006. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes *in vitro*. *Reproduction* 131, 247–258.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R.M., Rebollar, P.G., Lorenzo, P.L., 2007a. Desarrollo folicular en la coneja. *ITEA* 103, 1–13.
- Arias-Álvarez, M., López-Béjar, M., Rebollar, P.G., García-García, R.M., Lorenzo, P.L., 2007b. Nuclear and cytoplasmic patterns of rabbit IVM oocytes. *ITEA* 28, 42–44.
- Arias-Álvarez, M., García-García, R.M., Revuelta, L., Rebollar, P.G., Lorenzo, P.L., 2008. Effects of leptin supplementation on nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation of rabbit oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 198.
- Ashworth, C.J., Antipatis, C., Beattie, L., 1999. Effects of pre- and post-mating nutritional status on hepatic function, progesterone concentration, uterine protein secretion and embryo survival in Meishan pigs. *Reprod. Fertil. Dev.* 11, 67–73.
- AOAC International, 2000. Official Methods of Analysis, 17th Ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg MD, USA.
- Blake, C.A., 1974. Differentiation between the “critical period,” the “activation period” and the “potential activation period” for neurohumoral stimulation of LH release in proestrous rats. *Endocrinology* 95, 572–578.
- Boletín Oficial del Estado (BOE), 2005. Real Decreto 1201/2005. Sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. *B.O.E.* 252, 34367–34391.
- Bonanno, A., Mazza, F., Di Grigoli, A., Alicata, M.L., 2004. Effects of restricted feeding during rearing, combined with a delayed first insemination, on reproductive activity of rabbit does. *Proc. 8th World rabbit Congr.*, Puebla, México, pp. 224–230.
- Borwick, S.C., Rhind, S.M., McMillen, S.R., Racey, P.A., 1997. Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on fetal ovarian development in mid gestation. *Reprod. Fertil. Dev.* 9, 711–715.
- Brecchia, G., Bonanno, A., Galeati, G., Federici, G., Maranesi, M., Gobetti, A., Zerani, M., Boiti, C., 2006. Hormonal and metabolic adaptation to fasting: effects on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. *Domest. Anim. Endocrinol.* 31, 105–122.
- Castellini, C., Canali, C., Boiti, C., 1998. Effect of mother–litter separation for 24 hours by closing the nestbox or change of cage, on rabbit doe reproduction performance. *World Rabbit Sci.* 6, 199–203.
- Castellini, C., Dal Bosco, A., Cardinali, R., 2006. Long term effect of post-weaning rhythm on the body fat and performance of rabbit does. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 195–204.
- Cervero, A., Horcajadas, J.A., Martín, J., Pellicer, A., Simón, C., 2004. The leptin system during human endometrial receptivity and preimplantation development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89, 2442–2451.
- Cheung, C.C., Thornton, J.E., Kuijper, J.L., Weigle, D.S., Clifton, D.K., Steiner, R.A., 1997. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 138, 855–858.
- Chilliard, Y., Delavaud, C., Bonnet, M., 2005. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29, 3–22.
- Considine, R.V., Caro, J.F., 1997. Leptin and the regulation of body weight. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1255–1272.
- Corino, C., Mourou, J., Magni, S., Pastorelli, G., Rosi, F., 2002. Influence of dietary conjugated linoleic acid on growth, meat quality, lipogenesis, plasma leptin and physiological variables of lipid metabolism in rabbits. *J. Anim. Sci.* 80, 1020–1028.
- Craig, J., Zhu, H., Dyce, P.W., Petrik, J., Li, J., 2004. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 145, 5355–5363.
- De Blas, C., Mateos, G.G., 1998. In: De Blas, C., Wiseman, J. (Eds.), *The nutrition of the rabbit*. Commonwealth Agricultural Bureau, Wallingford, R.U., pp. 241–253.
- De Blas, J.C., Santomá, G., Carabaño, R., Fraga, M.J., 1986. Fiber and starch levels in fattening rabbit diets. *J. Anim. Sci.* 63, 1897–1904.
- De Blas, J.C., Taboada, E., Mateos, G.G., Nicodemus, N., Méndez, J., 1995. Effect of substitution of starch for fiber and fat in isoenergetic diets on nutrient digestibility and reproductive performance of rabbits. *J. Anim. Sci.* 73, 1131–1137.
- De Blas, C., García, J., Carabaño, R., 1999. Role of fiber in rabbit diets. A review. *Ann. Zootech.* 48, 3–13.
- Delavaud, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Bocquier, F., Kann, G., Chilliard, Y., 2002. Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J. Anim. Sci.* 80, 1317–1328.
- Depoortere, I., Thijs, T., Keith Jr., J., Peeters, T.L., 2004. Treatment with interleukin-11 affects plasma leptin levels in inflamed and non-inflamed rabbits. *Regul. Pept.* 15, 149–156.
- Diekmann, M.A., Malven, P.V., 1973. Effect of ovariectomy and estradiol on LH patterns in ewes. *J. Anim. Sci.* 37, 562–567.
- Edwards, R.G., 1965. Maturation *in vitro* of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208, 349–351.
- Ferguson, E.M., Ashworth, C.J., Edwards, S.A., Hawkins, N., Hepburn, N., Hunter, M.G., 2003. Effect of different nutritional regimens before ovulation on plasma concentrations of metabolic and reproductive hormones and oocyte maturation in gilts. *Reproduction* 126, 61–71.
- Ferguson, E.M., Slevin, J., Edwards, S.A., Hunter, M.G., Ashworth, C.J., 2006. Effect of alterations in the quantity and composition of the pre-mating diet on embryo survival and foetal growth in the pig. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 89–103.
- Ferguson, E.M., Slevin, J., Hunter, M.G., Edwards, S.A., Ashworth, C.J., 2007. Beneficial effects of a high fibre diet on oocyte maturity and embryo survival. *Reproduction* 133, 433–439.
- Fortun-Lamothe, L., 2006. Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.* 93, 1–15.
- Foster, D.L., Nagatani, S., 1999. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. *Biol. Reprod.* 60, 205–215.
- García, J., Carabaño, R., Pérez-Alba, L., De Blas, C., 1996. Effect of fibre source on neutral detergent fibre digestion and caecal traits in rabbits. *Proceedings 6th World rabbit Congress*, Toulouse, France, vol. 1, pp. 175–179.
- Gidenne, T., Perez, J.M., 1994. Apports de lignines et alimentation du lapin en croissance. I. Conséquences sur la digestion et le transit. *Ann. Zootech.* 43, 313–322.

- González, R.R., Caballero-Campo, P., Jasper, M., Mercader, A., Devoto, L., Pellicer, A., Simón, C., 2006. Leptin and leptin receptor are expressed in the human endometrium and endometrial leptin secretion is regulated by the human blastocyst. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 4883–4888.
- Holt, J.A., Ewing, L.L., 1974. Acute dependence of ovarian progesterone output on the presence of placentas in 21-day pregnant rabbits. *Endocrinology* 94, 1438–1444.
- Jelinkova, L., Kubelka, M., Motlik, J., Guerrier, P., 1994. Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbits oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 37, 210–215.
- Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., Nakamura, A., Tanaka, T., 2002. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology* 143, 1922–1931.
- Keim, N.L., Stern, J.S., Havel, P.J., 1998. Relation between circulating leptin concentrations and appetite during a prolonged, moderate energy deficit in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 794–801.
- Kermabon, A.Y., Belair, L., Theau-Clement, M., Salesse, R., Djiane, J., 1994. Effects of anoestrus and bromocryptine treatment on the expression of prolactin and LH receptors in the rabbit ovary during lactation. *J. Reprod. Fertil.* 102, 131–138.
- Lefèvre, B., Caillol, M., 1978. Relationship of oestrus behaviour with follicular growth and sex steroid concentration in the follicular fluid in the domestic rabbit. *Anim. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 18, 1435–1441.
- Lorenzo, P.L., Illera, M.J., Illera, J.C., Illera, M., 1994. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J. Reprod. Fertil.* 101, 697–701.
- Lorenzo, P.L., Illera, J.C., Silvan, G., Munro, C.J., Illera, M.J., Illera, M., 1997. Steroid-level response to insulin-like growth factor-1 in oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Immunol.* 35, 11–29.
- Loneragan, P., Fair, T., Corcoran, D., Evans, A.C., 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 65, 137–152.
- Lozano, J.M., Loneragan, P., Boland, M.P., O'Callaghan, D., 2003. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction* 125, 543–553.
- McEvoy, T.G., Sinclair, K.D., Staines, M.E., Robinson, J.J., Armstrong, D.G., Webb, R., 1997. In vitro blastocyst production in relation to energy and protein intake prior to oocyte collection. *J. Reprod. Cadem. Abstr. Ser.* 19, 132.
- Mertens, D.R., 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. *J. Assoc. Off. Assoc. Chem. Int.* 85, 1217–1240.
- Moschos, S., Chan, J.L., Mantzoros, C.S., 2002. Leptin and reproduction: a review. *Fertil. Steril.* 77, 433–444.
- Nicodemus, N., Carabaño, R., Gracia, J., Méndez, J., De Blas, C., 1999. Performance response of lactating and growing rabbits to dietary lignin content. *Anim. Feed Sci. Technol.* 80, 43–54.
- Nicodemus, N., García, J., Carabaño, R., De Blas, J.C., 2007. Effect of substitution of a soybean hull and grape seed meal mixture for traditional fiber sources on digestion and performance of growing rabbits and lactating does. *J. Anim. Sci.* 85, 181–187.
- Nizza, A., Dimeo, C., Esposito, L., 1997. Influence of the diet used before and after the first mating on reproductive performance of rabbit does. *World Rabbit Sci.* 5, 107–110.
- O'Callaghan, D., Yaakub, H., Hyttel, P., Spicer, L.J., Boland, M.P., 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 118, 303–313.
- Parigi-Bini, R., Xiccato, G., Cinetto, M., Dalle-zotte, A., 1992. Energy and protein utilization and partition in rabbit does concurrently pregnant and lactating. *Anim. Prod.* 55, 153–162.
- Parigi-Bini, R., Xiccato, G., Dalle Zotte, A., Carazzolo, A., 1994. Effets de différents niveaux de fibres alimentaire sur l'utilisation digestive et la qualité bouchère chez le lapin. *Proc. 6^{ème} Journ. Rech. Cunicole, La Rochelle, France*, pp. 347–354.
- Pascual, J.J., Cervera, C., Blas, E., Fernandez-carmona, J., 1998. Effect of high fat diets on the performance and food intake of primiparous and multiparous rabbit does. *Anim. Sci.* 66, 491–499.
- Pascual, J.J., Cervera, C., Fernández-Carmona, J., 2002. A feeding program for young rabbit does based on all lucerne diets. *World Rabbit Sci.* 10, 7–13.
- Pau, K.Y., Spies, H.G., 1986. Estrogen-dependent effects of norepinephrine on hypothalamic gonadotropin-releasing hormone release in rabbit. *Brain Res.* 399, 15–23.
- Pau, C.Y., Pau, K.Y., Berria, M., Spies, H., 2000. Ovarian influence on gonadotropin and prolactin release in mated rabbits. *Endocrine* 13, 25–35.
- Paula-Lopes, F.F., Boelhaue, M., Habermann, F.A., Sinowatz, F., Wolf, E., 2007. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms. *Biol. Reprod.* 8, 532–541.
- Pereda, N., Rebollar, P.G., Schwarz, B.F., Arias-Álvarez, M., Revuelta, L., Lorenzo, P.L., Nicodemus, N., 2007. Estudio de la composición corporal de conejas reproductoras mediante la técnica de Impedancia Bioeléctrica (BIA). Parte II: Ecuaciones de Predicción. *II Congreso Ibérico de Cunicultura, Vila Real, Portugal*, pp. 17–20.
- Pérez, J.M., Lebas, F., Gidenne, T., Maertens, L., Xiccato, G., Parigi-Bini, R., Dalle Zotte, A., Cossu, M.E., Carazzolo, A., Villamide, M.J., Carabaño, R., Fraga, M.J., Ramos, M.A., Cervera, C., Blas, E., Fernández, J., Falcao, E., Cunha, L., Bengala Freire, J., 1995. European reference method for in vitro determination of diet digestibility in rabbits. *World Rabbit Sci.* 3, 41–43.
- Plachot, M., Crozet, N., 1992. Fertilization abnormalities in human in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.* 7 (Suppl 1), 89–94.
- Quesnel, H., Pasquier, A., Mounier, A.M., Prunier, A., 1998. Influence of feed restriction during lactation on gonadotropic hormones and ovarian development in primiparous sows. *J. Anim. Sci.* 76, 856–863.
- Rebollar, P.G., Ubilla, E., Rodriguez, J.M., 1992. Influence of the parturition-insemination interval on the conception rate in rabbits artificially inseminated with fresh semen. *J. Appl. Rabbit Res.* 15, 407–415.
- Rebollar, P.G., Bonanno, A., Di Grigoli, A., Tornambè, G., Lorenzo, P.L., 2008. Endocrine and ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 316–328.
- Rhind, S.M., Martin, G.B., McMillen, S., Tsonis, C.G., McNeilly, A.S., 1989. Effect of level of food intake of ewes on the secretion of LH and FSH and on the pituitary response to gonadotrophin-releasing hormone in ovariectomized ewes. *J. Endocrinol.* 121, 325–330.
- Rizos, D., Kenny, D.A., Griffin, W., Quinn, K.M., Duffy, P., Mulligan, F.J., Roche, J.F., Boland, M.P., Loneragan, P., 2008. The effect of feeding polypropylene glycol to dairy cows during the early postpartum period on follicular dynamics and on metabolic parameters related to fertility. *Theriogenology* 69, 688–699.
- Robinson, R.S., Hammond, A.J., Wathes, D.C., Hunter, M.G., Mann, G.E., 2008. Corpus luteum–endometrium–embryo interactions in the dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance. *Reprod. Domest. Anim.* 43 (Suppl. 2), 104–112.
- Rommers, J.M., Meijerhof, R., Noordhuizen, J.P.T.M., Kemp, B., 2002. Relationships between body weight at first mating and subsequent body development, feed intake, and reproductive performance of rabbit does. *J. Anim. Sci.* 80, 2036–2042.
- Rommers, J.M., Meijerhof, R., Noordhuizen, J.P.T.M., Kemp, B., 2004. Effect of feeding program during rearing and age at first insemination on performances during subsequent reproduction in young rabbit does. *Reprod. Nutr. Dev.* 44, 321–332.
- SAS Institute, 2001. *SAS/STAT User's Guide* (Release 8.2). SAS Inst. Inc., Cary NC, USA.
- Schmell, E.D., Gulyas, B.J., Hedrick, J.L., 1983. Egg surface changes during fertilization and the molecular mechanism of the block to polyspermy. In: Hartmann, J.F. (Ed.), *Mechanism and control of animal fertilization*. Academic Press, New York, pp. 365–413.
- Sirard, M.A., Richard, F., Blondin, P., Robert, C., 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology* 65, 126–136.
- Swantek, P.M., Crenshaw, J.D., Marchello, M.J., Lukaski, H.C., 1992. Bioelectrical impedance: a nondestructive method to determine fat-free mass of live market swine and pork carcasses. *J. Anim. Sci.* 70, 169–177.
- Thorn, S.R., Meyer, M.J., Van Amburgh, M.E., Boisclair, Y.R., 2007. Effect of estrogen on leptin and expression of leptin receptor transcripts in prepubertal dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 90, 3742–3750.
- Tonetta, S.A., diZerega, G.S., 1989. Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocr. Rev.* 10, 205–229.
- Van Soest, P.J., 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University Press, Ithaca.
- Van Soest, J.P., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Wallach, E.E., Noriega, C., 1970. Effects of local steroids on follicular development and atresia in the rabbit. *Fertil. Steril.* 21, 253–267.
- Xiccato, G., Bernardini, M., Castellini, C., Dalle Zotte, A., Queaque, P.I., Trocino, A., 1999. Effect of post-weaning feeding on the performance and energy balance of female rabbits at different physiological states. *J. Anim. Sci.* 77, 416–426.
- Yamaji, T., Dierschke, D.J., Bhattacharya, A.N., Knobil, E., 1972. The negative feedback control by estradiol and progesterone of LH secretion in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology* 90, 771–777.
- Yanagimachi, R., 1994. *Mammalian fertilization*. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 189–279.
- Yang, X., Kubota, C., Suzuki, H., Taneja, M., Bols, P.E., Presicce, G.A., 1998. Control of oocyte maturation in cows biological factors. *Theriogenology* 49, 471–482.

- Yang, H., Foxcroft, G.R., Pettigrew, J.E., Johnston, L.J., Shurson, G.C., Costa, A.N., Zak, L.J., 2000. Impact of dietary lysine intake during lactation on follicular development and oocyte maturation after weaning in primiparous sows. *J. Anim. Sci.* 78, 993–1000.
- Younglai, E.V., 1978. Luteinizing hormone response of castrated rabbits to treatment with testosterone propionate and estradiol benzoate. *Neuroendocrinology* 25, 22–31.
- Zerani, M., Boiti, C., Zampini, D., Brecchia, G., Dall'Aglio, C., Ceccarelli, P., Gobbetti, A., 2004. Ob receptor in rabbit ovary and leptin *in vitro* regulation of corpora lutea. *J. Endocrinol.* 183, 279–288.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425–432.

EXPERIMENTO 2b. Estudio del efecto a medio plazo del sistema de alimentación durante la recría mediante la administración de un pienso fibroso, con alto contenido en lignina, sobre la composición corporal, el estatus ovárico y el desarrollo embrionario temprano preimplantacional en conejas primíparas lactantes inseminadas en un periodo próximo al parto (día 11 post-parto).

Follicular, oocyte and embryo features related to metabolic status in primiparous lactating does fed with high- fibre rearing diets.

4.4.1. Resumen

La capacidad de ingestión de las conejas primíparas durante la primera lactación aumenta. Sin embargo, ésta es insuficiente para cubrir sus necesidades energéticas generando una pérdida de su condición corporal, que afecta a la competencia del oocito y del embrión y, en último término, a la fertilidad cuando son inseminadas con un ritmo semi-intensivo de producción. La administración de dietas fibrosas durante la recría podrían aumentar la capacidad de ingestión de las conejas primíparas durante su primera lactación. Sin embargo, el efecto a medio plazo de este tipo de estrategias nutricionales sobre el estatus ovárico en las conejas primíparas no se conoce en profundidad. Así pues, el objetivo del Experimento 2b fue estudiar el efecto de la administración durante la recría de piensos fibrosos con diferente contenido en lignina sobre la composición corporal, el estatus metabólico, endocrino y ovárico, así como el desarrollo embrionario preimplantacional temprano en conejas primíparas lactantes inseminadas en un periodo próximo al parto (día 11 post-parto) (ver esquema de diseño experimental).

Las conejas alimentadas con el pienso HL no mostraron ningún aumento en la capacidad de ingestión durante la lactación temprana. A su vez, los tratamientos nutricionales no modificaron los pesos, los parámetros metabólicos medidos ni la composición corporal durante este periodo. En ambos grupos nutricionales, estos parámetros evolucionaron favorablemente desde el parto hasta el momento de la IA: los niveles séricos de proteínas totales y de leptina aumentaron, mientras que las concentraciones de NEFA disminuyeron reflejando una reducción de la movilización de grasa corporal en concordancia con el aumento significativo de proteína, grasa corporal y de contenido energético. A nivel ovárico, las dietas experimentales no afectaron a los niveles séricos de estradiol y progesterona, así como a la población de folículos antrales en el día de la IA. La tasa de maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos *in vitro* fue también similar. Sin embargo, los oocitos de las conejas del grupo HL, mostraron una incidencia mayor de alteraciones en los patrones de migración de gránulos corticales, un índice mayor de atresia folicular, un número menor de embriones viables y una tasa mayor de embriones degenerados en el momento de la obtención. Cuando los embriones viables de ambos grupos experimentales se cultivaron *in vitro* en un medio similar no mostraron diferencias significativas en su capacidad de desarrollo. Finalmente, la fertilidad fue similar en ambos tratamientos nutricionales.

Los resultados de este estudio, nos permiten concluir que las estrategias nutricionales basadas en la administración de piensos fibrosos con alto contenido en lignina durante la recría no mejoran ni la capacidad de ingestión, ni el estatus metabólico y corporal durante la lactación temprana, ni la competencia del oocito y del embrión en las conejas primíparas inseminadas en el día 11 post-parto.

4.4.2. Diseño experimental

Se utilizaron un total de 60 conejas primíparas híbridos de Neozelandés blanco x California, que fueron alimentadas desde las 11 semanas de edad hasta su primer parto con piensos fibrosos, suministrados *ad libitum*. Un pienso con un contenido estándar de lignina ácido detergente (LAD) [grupo SL, 4,9% LAD sobre Materia Seca (MS), n = 30] y un pienso experimental alternativo con un contenido alto en LAD (grupo HL, 15,8% LAD sobre MS, n = 30). Después del parto las conejas primíparas lactantes comieron *ad libitum* un pienso comercial estándar formulado para conejas lactantes y gazapos.

Las hembras nulíparas fueron inseminadas a las 16 semanas de edad y una vez paridas, las primíparas se inseminaron el día 11 post-parto. La capacidad de ingestión fue calculada durante la primera lactación, desde el día del parto hasta el momento de la IA (día 11). En ambos puntos se determinó el peso de las conejas, la composición corporal y los niveles séricos de proteínas totales, NEFA y leptina, relacionándolos con el estatus metabólico y la reserva energética de las madres.

El día de la IA, además, se eutanasieron un total de 20 animales para valorar el estatus ovárico en los diferentes grupos experimentales:

- ❖ el día 11 post-parto antes de la IA (Grupo G1): 10 hembras fueron distribuidas entre el Grupo SL (n = 5) y el Grupo HL (n = 5).
 - en estos grupos se determinaron los niveles séricos de estradiol y progesterona, el peso de los ovarios, se categorizó la población folicular y se valoró el grado de atresia folicular, así como la capacidad de maduración nuclear y citoplasmática *in vitro* de los oocitos.
- ❖ 3,5 días después de la IA (Grupo G2): 10 hembras fueron distribuidas entre el Grupo SL (n = 5) y el Grupo HL (n = 5).
 - en estos grupos se determinaron la tasa de ovulación, la tasa de viabilidad embrionaria a la recogida y la capacidad de desarrollo embrionario *in vitro*.

En los animales restantes se determinaron los parámetros de fertilidad al segundo parto.

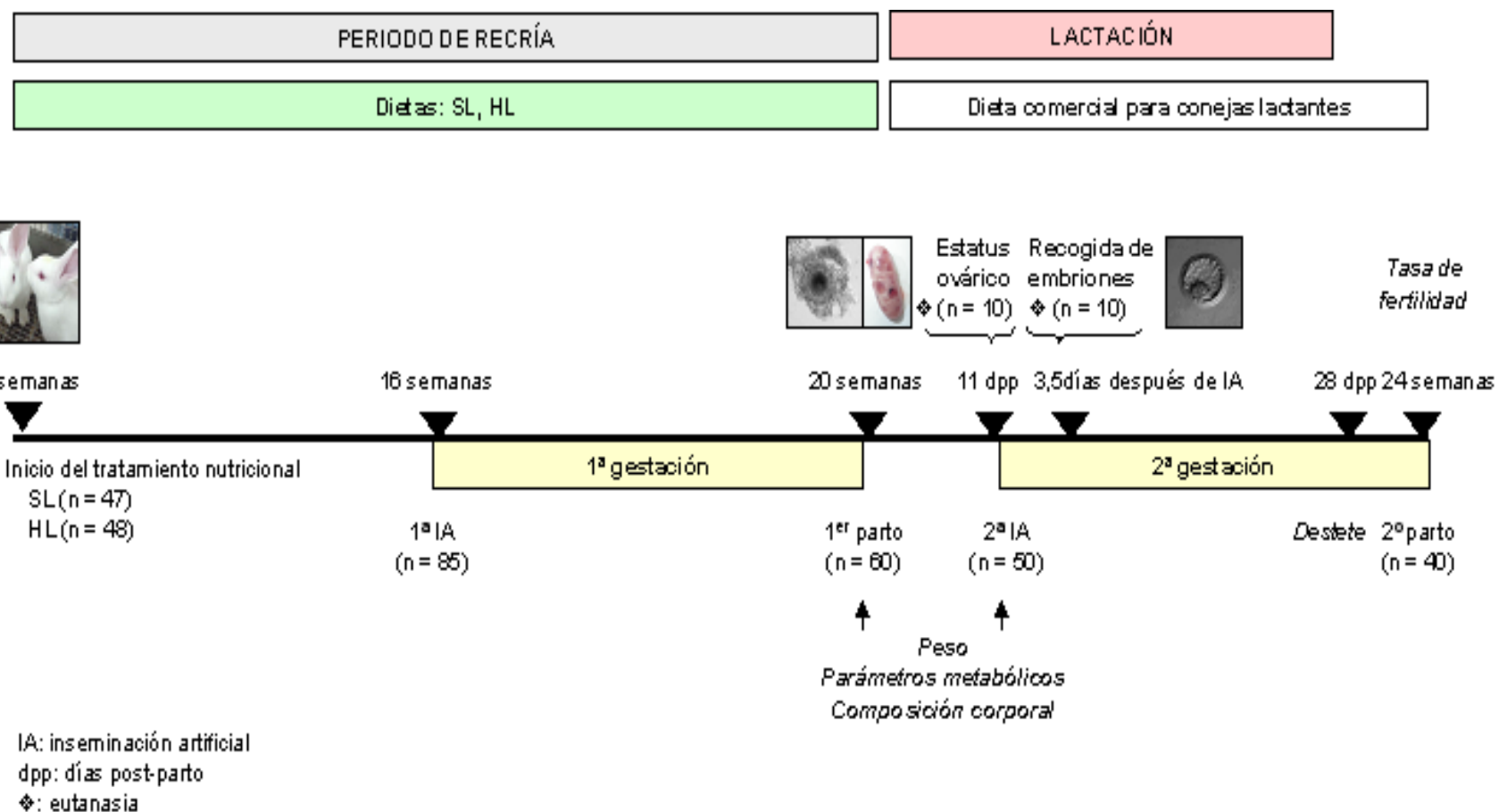


Imagen 4.4. Representación esquemática del diseño correspondiente al Experimento 2b, para determinar la composición corporal, el estatus metabólico y ovárico en el momento de la primera IA y el desarrollo embrionario preimplantacional en conejas primíparas en alimentadas con piensos fibrosos con un contenido estándar de lingina (Grupo SL) o elevado (Grupo HL) durante la recría.

Reproduction in Domestic Animals

Follicular, oocyte and embryo features related to metabolic status in primiparous lactating does fed with high-fibre rearing diets.



Journal:	<i>Reproduction in Domestic Animals</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Arias-Alvarez, M; Universidad Complutense de Madrid, Fisiología (Fisiología Animal) García-García, RM; Universidad Complutense de Madrid, Fisiología (Fisiología Animal) García-Rebollar, Pilar; UPM (Universidad Politécnica de Madrid), Producción Animal Nicodemus, N; UPM (Universidad Politécnica de Madrid), Producción Animal Millan, P; Universidad Complutense de Madrid, Fisiología (Fisiología Animal) Revuelta, L; Universidad Complutense de Madrid, Fisiología (Fisiología Animal) Lorenzo, Pedro; Universidad Complutense de Madrid, Fisiología (Fisiología Animal)
Subject Area:	Animal breeding < General reproduction, Endocrinology < General reproduction, Embryo/fetus < General reproduction, Management < General reproduction, other < Species:

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 Madrid, Spain

2 Short title: Rearing diet in reproduction of primiparous does

3

4 **Follicular, oocyte and embryo features related to metabolic status in primiparous**

5 **lactating does fed with high-fibre rearing diets.**

6

7 M Arias-Álvarez ^a, RM García-García ^a, PG Rebollar ^b, N Nicodemus ^b, P Millán ^a, L

8 Revuelta ^a, PL Lorenzo ^{a*}

9

10 ^a *Dpto. Fisiología (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de*

11 *Madrid. Ciudad Universitaria, s/n, 28040, Madrid, Spain.*

12 ^b *Dpto. Producción Animal. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad*

13 *Universitaria, s/n, 28040, Madrid, Spain.*

14

15

16

17 *Corresponding author: plorenzo@vet.ucm.es

18 Phone: 00 34 913943842

19 Fax: 00 34 913943835.

Abstract

Fertility of primiparous lactating does in early *postpartum* period is very low mainly due to pronounced negative energy intake, which may influence oocyte and embryo developmental competence. The aim of this work was to study follicular, oocyte and embryo features and their relationship to serum endocrine and metabolic parameters, body composition and conception rate in primiparous does fed with high-lignin fibre diet during the rearing period. Diets with high-lignin [HL: 15.8% dry matter (DM)] or standard-lignin content (SL: 4.9% DM) were supplied until parturition time in order to increase their feed intake in early *postpartum*. No diet effect in serum oestradiol and progesterone concentrations between nutritional groups was found. Follicle categories in the histological study were also similar. Confocal assess showed that metaphase II rate of *in vitro*-matured oocytes was significantly higher in the SL vs. the HL group ($P<0.001$). Cortical granule (CG) migration index was similar in both treatments, but rates of cytoplasmically degenerated oocytes were significantly lower in the SL group than in the HL group ($P<0.05$), as well as follicular atresia rate assessed by the TUNEL method ($P<0.005$). In addition, HL-fed does showed lower number of viable embryos and higher rate of retarded *in vivo* recovered embryos compared to the SL group ($P<0.05$). Neither *in vitro* embryo development of viable embryos nor conception rate were significantly different between groups. Feed intake increased during first pregnancy in the HL group ($P<0.05$), but not during early lactation. Serum protein, non-esterified fatty acid (NEFA) and leptin concentrations, as well as estimated body composition were similar in does fed with both diets. In conclusion, enhancement of reproductive management by using highly-lignified products in rearing diets does not seem to report physiological reproductive benefits in primiparous lactating does.

Key words: follicular apoptosis; oocyte maturation; embryo; metabolic status; lignin diet; rabbit.

1
2
3 45
4
5
6 46 **1. Introduction**
7

8 47 The fertility rate of high-yield primiparous rabbit does is especially low when they are
9
10 48 inseminated shortly after kindling (Rebollar et al., 2006). In this moment, energy from feed
11
12 49 intake is insufficient to cover the energy needs for lactation and growth of primiparous
13
14 50 mothers (Parigi-Bini et al., 1992; Pascual et al., 2002). It is well known that this situation
15
16 51 causes a negative energy balance (NEB) in the first lactation when does are inseminated
17
18 52 (Fortun-Lamothe, 2006). This NEB in the early *postpartum* (*pp*) period is associated with
19
20 53 endocrine and metabolic changes, as reflected in the environment of the growing and
21
22 54 maturing female gametes. This results in ovulation of developmental incompetent oocytes
23
24 55 (Leroy et al., 2008), and presumably affects embryo survival, as previously reported (bovine:
25
26 56 Leroy et al., 2005; gilt: Ferguson et al., 2006).
27
28
29
30
31
32 57

33
34 58 Much nutritional management strategies have been driven to increase diet energy level before
35
36 59 insemination in several species (ewe: O'Callaghan et al., 2000; gilt: Ferguson et al., 2003;
37
38 60 rabbit: Pascual et al., 2003). In rabbits, alternative feeding strategies have been proposed to
39
40 61 increase feed ingestion capacity in their first lactation (Xiccato et al., 1999; Pascual et al.,
41
42 62 2002; Arias-Álvarez et al., 2009). In this sense, fibre is one of the main constituents of
43
44 63 commercial diets for intensively-reared rabbits (De Blas et al., 1999). Particularly,
45
46 64 indigestible and inexpensive lignin increases voluntary feed intake and gut content during this
47
48 65 period (García et al., 1999; Nicodemus et al., 1999; Gidenne, 2003). Therefore, lignin
49
50 66 supplementation during rearing should enhance energy intake after the first parity, when a
51
52 67 more concentrated feed will be furnished, reducing lactation energy deficit (Nizza et al., 1997;
53
54 68 Xiccato et al., 1999; Pascual et al., 2002). However, the reproductive results of this type of
55
56 69 strategies are scarce and controversial.
57
58
59
60

70

71 Using different feeding strategies and analyzing their influence on reproductive physiology

72 are crucial to understand the complexity of nutritional treatments to enhance the reproductive

73 managements in industrial rabbit breeding. Therefore, the aim of the present study was to

74 determine the long-term effects on ovarian status, embryo development and conception rate of

75 a high-lignin fibre diet supplied during the rearing period, and their relationship to serum

76 endocrine and metabolic parameters, body composition and feed intake during the early

77 *postpartum* in primiparous does submitted to a semi-intensive reproductive rhythm of

78 production (inseminated on day 11 *pp*).

79

80 2. Materials and methods

81

82 Unless otherwise stated, all the chemicals were purchased from Sigma® Chemical Company

83 (St. Louis, MO, USA). Experimental procedures were approved by the Animal Ethics

84 Committee of the Polytechnic University of Madrid (Spain) and were in compliance with the

85 Spanish guidelines for care and use of animals in research (BOE, 2005).

86

87 2.1. Animals and experimental design

88

89 New Zealand x California white rabbit does (*Oryctolagus cuniculus*) were housed on the

90 experimental farm at the Animal Production Department, Polytechnic University of Madrid

91 (Spain), in individual flat-deck cages under a constant photoperiod of 16 hours of light per

92 day, a temperature of 18-22 °C and a relative humidity of 60-75% maintained by a forced

93 ventilation system.

94

1
2
3 95 Experimental design is shown in Fig. 1. Briefly, a total of 95 nulliparous does were randomly
4
5 96 assigned to be fed *ad libitum* with the standard-lignin diet (SL group, n = 47) or with the high-
6
7
8 97 lignin diet (HL group, n = 48) during the rearing period until the first parturition. The SL diet
9
10 98 was formulated to contain a standard proportion of lignified fibre [40.9% Neutral Detergent
11
12 99 Fibre (NDF) and 4.9% Acid Detergent Lignin (ADL) on dry matter basis (DM)]. The HL diet
13
14
15 100 was formulated to contain a high proportion of lignified fibre [49.6% NDF and 15.8% ADL
16
17 101 on DM basis] (Table 1). After parturition, primiparous lactating does were fed a commercial
18
19 102 diet for lactating does (Cunimax A®, Cargill S.A., Zaragoza, Spain).
20
21
22 103
23
24 104 The first artificial insemination (AI) in all nulliparous does was performed at 16 weeks of age.
25
26 105 The second AI was carried out at day 11 *pp*, following a semi-intensive reproductive rhythm,
27
28 106 in 60 primiparous does randomly assigned to both nutritional groups (HL group, n = 30 and
29
30 107 SL group n = 30). Litter size of the mothers was equalized to eight kits one day after
31
32 108 parturition, and weaning was done at day 28 *pp*. Lactating does were oestrus-synchronized by
33
34 109 transient doe-litter separation during 24 h before AI according to Alvariño et al. (1998).
35
36 110 Insemination was carried out using a pool of fresh heterospermic semen with more than 20
37
38 111 million spermatozoa in 0.5 ml of a commercial diluent (Magapor®, S.L., Spain). Ovulation
39
40 112 was induced by intramuscular injection of 1 µg buserelin (Suprafact®, Hoechst Marion
41
42 113 Roussel, S.A., Madrid).
43
44 114
45
46
47
48
49
50 115 Daily feed intake during the first pregnancy and early lactation was measured in all animals.
51
52 116 Live body weight (LBW), estimated body composition and serum concentrations of total
53
54 117 protein, non-esterified fatty acids (NEFA) and leptin were determined at parturition day and
55
56 118 on day 11 *pp* (AI time). Ovarian status of primiparous does at insemination measured by
57
58 119 serum concentrations of steroid hormones (oestradiol-17β and progesterone) was recorded. To
59
60

1
2
3 120 further determine ovarian physiology, five animals in each nutritional group were euthanized
4
5 121 with 30 mg/Kg i.v. of pentobarbital sodium (Dolethal®, Vetoquinol, Spain) before AI at day
6
7
8 122 11 *pp* (G1 group), and the other five 3.5 days after AI (G2 group). In the G1 group, both
9
10 123 ovaries were weighted and one of them preserved for histological studies –follicular
11
12 124 categorization and apoptosis assessment, and the other one was used for *in vitro* maturation
13
14 125 assessment. In the G2 group, ovulation rate, embryo viability and *in vitro* embryo
15
16 126 development were studied. Finally, conception rate (number of parturitions per number of
17
18 127 inseminations x 100) of the remaining primiparous does in both the HL group (n = 20) and the
19
20 128 SL group (n = 20) was recorded.
21
22
23
24
25 129

26 27 130 2.2. Blood sampling and serum analyses 28 29 131

30
31 132 Blood samples were collected from the margin ear vein into non-heparinized tubes at 9:00 h
32
33 133 a.m. to avoid circadian variations. Serum was obtained after centrifugation at 1200 g for 10
34
35 134 min at 4 °C and stored at –32 °C until analysed.
36
37
38
39 135

40
41 136 *Protein.* Serum total protein was determined by the Biuret method, according to Tietz (1995).
42
43 137 In alkaline media, cupric ions interact with protein peptide bonds, resulting in the formation
44
45 138 of a coloured complex. This method is linear up to 13 g/dl.
46
47
48 139

49
50 140 *Non-esterified fatty acids (NEFA).* Serum NEFA determinations were performed in duplicate
51
52 141 samples using a two-reaction, enzymatic-based colorimetric assay from Wako Pure Chemical
53
54 142 Industries®, Ltd. (Osaka, Japan), based on the ability of NEFA to acylate Coenzyme A in the
55
56 143 presence of CoA synthetase. The method is linear over the range from 0.0 to 2.0 mmol/l.
57
58
59 144

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Leptin. Serum leptin concentrations were determined in duplicate samples by a double antibody RIA using a multi-species leptin RIA kit® (LINCO Research Inc., St. Charles, MO, USA), as previously reported in rabbits (Depoortere et al., 2004; Brecchia et al., 2006). Intra and inter-assay coefficients of variation were 3.1% and 7.3%, respectively. The detection limit after adjusting the standard curve to rabbit values was 0.1ng/ml HE (Human Equivalent).

Oestradiol-17β (E₂) and Progesterone (P₄). Serum E₂ and P₄ concentrations were measured in duplicate samples by specific chemiluminiscence methods (CMIA®, Abbott laboratories, Abbott Park, IL, USA). For oestradiol detection, purified rabbit anti-oestradiol monoclonal antibodies were used. Progesterone detection was achieved by using rabbit anti-progesterone polyclonal antibodies. Intra and inter-assay coefficients of variation were 6.6% and 7% for E₂, and 5.8% and 6.3% for P₄, respectively. The detection limit was 10 pg/ml for E₂ and 0.2 ng/ml for P₄.

2.3. Follicular classification

Number of preovulatory follicles ≥ 1 mm on the ovarian surface was first recorded. Then, the ovaries were placed into a 4%-buffered neutral paraformaldehyde solution (pH 7.2–7.4). All samples were gradually dehydrated with increasing concentrations of ethyl alcohol (50–100%). These dehydrated specimens were first embedded in paraffin, prepared by sectioning at 5 μ m and stained with hematoxylin/eosin. In order to study follicle population, hystological sections of each half ovary were examined at light microscope (Olympus BX40). Rabbit ovarian follicles were categorized into four specific development stages related to the number

of layers of granulosa cells according to Arias-Álvarez et al. (2007a) and Rebollar et al. (2008), namely, primordial, primary, secondary and antral follicles.

2.4. Follicular atresia assay

DNA strand breaks occurred during the cell apoptosis process were detected using the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labelling (TUNEL; In Situ Cell Death Detection Kit, POD®, Roche Diagnostics S.L., Applied Science, Barcelona, Spain) as previously reported by García-García et al. (*In press*) with some modifications. Briefly, dewaxed, rehydrated sections by standard methods were first carried out. The slides were then pretreated with 20 µg/ml of proteinase K working solution for 30 min in a humidified dark chamber at 37°C. Incubation with the TUNEL reaction mixture took place in a humidified dark chamber at 37°C for 1 h. After each step of the procedure, sections were rinsed three times in phosphate-buffered saline (PBS). Finally, the slides were covered with Vectashield mounting medium with 4',6-diamino-2-phenylindole® (DAPI) (Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, UK). Positive control sections were treated with DNase I® for 10 min at room temperature in a humidified chamber (Roche Diagnostics S.L., Applied Science, Barcelona, Spain) before incubation with the TUNEL reaction mixture. For negative controls, samples were just incubated with the label solution of the TUNEL reaction mixture without enzymatic solution. TUNEL-stained and DAPI-counterstained slides were observed under a fluorescent microscope (Leica, F550). Green fluorescence could be visualized only in TUNEL-positive cells (Fig. 2). Primordial follicular population was omitted. Follicles in medium or advanced stage of atresia were examined according to Kasuya (1995), and the percentage of apoptosis expressed is the number of TUNEL-positive follicles divided by the total number of recorded follicles.

1
2
3 194
4
5
6 195 2.5. *Oocyte collection and in vitro maturation*
7
8 196
9
10 197 The remaining ovaries were placed in PBS at 37°C and transported to the laboratory.
11
12 198 Cumulus-oocyte complexes (COC) were obtained from ovarian follicles ≥ 1 mm by aspiration
13
14
15 199 with a 25 gauge needle. Compact cumulus cells were washed and placed in 500 μ l of
16
17
18 200 maturation medium in four-well dishes and cultured for 16 h at 38°C under an atmosphere of
19
20 201 5% CO₂ in air with maximum humidity. The maturation medium consisted of Tissue Culture
21
22 202 Medium (TCM-199) with 2mM L-glutamine, 0.1 mg/ml sodium pyruvate supplemented with
23
24 203 10% Foetal Calf Serum (FCS), 10 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) and 100 ng/ml
25
26 204 Insuline Growth Factor (IGF) according to Lorenzo et al. (1997).
27
28
29 205
30
31
32 206 2.6. *Confocal microscopy study*
33
34 207
35
36 208 After the maturation period, COC were treated for the confocal study as previously reported
37
38 209 by Arias-Álvarez et al. (2009). Briefly, cumulus cells were removed with 2mM hyaluronidase
39
40 210 by gentle pipetting. Then, oocytes were treated with 0.5% pronase to digest the zone
41
42 211 pellucida, fixed in PBS containing 4%-buffered neutral paraformaldehyde solution (pH 7.2–
43
44 212 7.4) and stored in PBS. Oocytes were washed with permeabilizing solution (0.02% Triton
45
46 213 X-100) and treated for 40 min with blocking solution [7.5% Bovine Serum Albumin (BSA)].
47
48 214 They were then incubated for 30 min at room temperature with 100 μ g/ml fluorescein
49
50 215 isothiocyanate of *lens culinaris* (FITC-LCA) for cortical granule (CG) staining and 15 min at
51
52 216 39°C with 10 μ g/ml Propidium Iodide for nuclear staining. After that, oocytes were mounted
53
54 217 between a coverslip and a glass slide supported by columns of paraffin and examined under a
55
56 218 confocal laser-scanning microscope (Leica, TCS SP5) (Fig. 3). Nuclear maturation was
57
58
59
60

measured in terms of metaphase II rate. According to previous work (Arias-Álvarez et al., 2007b), CG distribution was classified as follows (Fig. 3): a) peripheral: CG were adjacent to the plasma membrane, showing they were cytoplasmically matured; b) cortical: most of the CG were scattered throughout the cortical area, being considered as partially matured; c) homogeneous: CG were distributed throughout the cytoplasm, as they did not show cytoplasmic maturation; d) non homogeneous or abnormal: anomalous distribution of CG compatible to poor quality or degenerated oocytes.

2.7. Assessment of ovulation and embryo viability

The ovarian response in terms of ovulation rate (number of corpora lutea) and embryo recovery was assessed 3.5 days after AI. Embryos were recovered by flushing the reproductive tract with PBS + 0.1% BSA. Morphology of compact morulae and early blastocysts were evaluated immediately after recovering. Morphological viable embryos were *in vitro* cultured (IVC) and embryonic developmental competence was determined by assessing their developmental progression during 72 h with a stereomicroscope (Nikon, SMZ800). IVC medium consisted in TCM-199 supplemented with 10% FCS incubated at 38°C under an atmosphere with 5% CO₂ in air at maximum humidity. Embryos were classified on the basis of conventional morphological criteria and according to their development stage following the guidelines of the International Embryo Transfer Society. Viability rate at recovery time, number of unfertilized oocytes, degenerated and retarded embryos (embryos whose stage of development did not correspond to time after ovulation, i.e.: zygotes, 2-4, 5-8, 9-16 cell embryos and early morulae) were referred to the total number of recovered oocytes/embryos. The viability rate after IVC was obtained by dividing the number of progressed embryos after IVC by the number of cultured embryos.

1
2
3 244
4
5
6 245 2.8. *Analytical methods*
7
8 246
9
10 247 Chemical analysis of diets was done using the method of Van Soest et al. (1991) and Mertens
11
12 248 (2002) for NDF, and the official method (973.18) of the Association of Official Analytical
13
14 249 Chemists International (AOAC international, 2000) for acid detergent fibre (ADF) and acid
15
16 250 detergent lignin (ADL). Neutral detergent fibre, ADF and ADL were extracted successively
17
18 251 using the filter bag system® (Ankom Technology, New York) and corrected by ash content of
19
20 252 ADL residue. Procedures of the AOAC International (2000) were also used for dry matter
21
22 253 (DM; oven drying method: 930.15), ash (muffle furnace incineration: 923.03) and crude
23
24 254 protein (CP; Dumas method: 968.06; FP-528 LECO, St. Joseph, MI, USA). Gross energy was
25
26 255 determined in an adiabatic calorimeter. Digestible energy (DE) was determined in a faecal
27
28 256 digestibility trial according to the method of Pérez et al. (1995) using eight animals per diet.
29
30 257 Body composition was determined by BIA (bioelectrical impedance) according multiple
31
32 258 regression equations described by Pereda et al. (2007) to estimate water, protein, ash, fat and
33
34 259 energy content (%) in relation to live body weight.
35
36 260
37
38
39
40
41
42
43 261 2.9. *Statistical analysis*
44
45 262
46
47
48 263 Trial data were analysed as a completely randomised design using the Statistical Analysis
49
50 264 Systems (SAS/STAT User's Guide, Release 8.2, Inst. Inc, Cary NC, USA) and the SPSS
51
52 265 program for Windows (SPSS 13.0, Inc, Chicago, IL). Live body weight, estimated body
53
54 266 condition and serum metabolic parameters were analysed with a MIXED procedure of the
55
56 267 SAS program according to an auto-regressive model to analyze repeated measures, including
57
58 268 the effect of diet (HL and SL groups) and time (parturition and day 11 *pp*) as the main sources
59
60

of variation in the early *postpartum* period and their interactions. Does were considered a nested random effect in the treatment. Means were compared using a protected Student's *t* test. Means of feed intake between nutritional groups were analysed with a GLM procedure of the SAS program. Average serum oestradiol and progesterone concentrations, ovary weight and follicular categorization were compared using a protected Student's *t* test with the SPSS program, considering diet effect as the main source of variation. Chi-square test was carried out to compare the percentage of atretic follicles over the total number of follicles, the metaphase II rate and the peripheral, cortical, homogeneous and abnormal patterns of cortical granule migration index of IVM oocytes. The index of viable, degenerated and unfertilized oocytes, as well as *in vitro* embryo development after culture and conception rate between nutritional groups were analyzed by a chi-square test using the SPSS program. All the results are expressed as the mean \pm S.E.M. and statistical significance was accepted for $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Steroid concentrations, ovarian follicular categorization and atresia rate

The rearing diet did not exert a long-term effect on the average serum oestradiol and progesterone concentrations at AI time in primiparous does (Table 2).

Ovary weight and mean total of preovulatory ≥ 1 mm follicles in the ovarian surface per ovary at AI were similar between nutritional groups. In addition, histologically categorized follicular population ($n = 1206$ follicles) was not affected by the nutritional treatment used.

In order to assess follicular atresia, a total of 499 follicles were studied for apoptosis signs (HL group, $n = 250$; SL group, $n = 249$). Does submitted to HL diet during the rearing period

1
2
3 293 showed higher percentage of atretic follicles than the SL group on day 11 *pp* ($P < 0.005$; Fig.
4
5 294 2, Table 2).
6
7

8 295
9
10 296 *3.2. Oocyte in vitro maturation rate*
11
12

13 297
14
15 298 A total of 166 COC (HL group, $n = 97$; SL group, $n = 69$) were analysed, and significant
16
17 299 differences were found for both nuclear and cytoplasmic oocyte *in vitro* maturation measured
18
19 300 as metaphase II and cortical granule migration (CG) rate (Table 2). The SL group showed
20
21 301 higher nuclear maturation rate compared to the HL group ($P < 0.005$). Concerning CG
22
23 302 migration, the rate of cytoplasmically matured oocytes, measured as peripheral migration rate
24
25 303 of CG, was similar between groups. However, the HL group presented higher rate of oocytes
26
27 304 with abnormal movement or distribution of CG, compatible with oocyte low quality or
28
29 305 degeneration, compared to the SL group ($P < 0.05$).
30
31
32
33

34 306
35
36 307 *3.3. Ovulation rate, embryo viability and in vitro embryo developmental rate*
37
38

39 308
40
41 309 The ovulation rate per female was similar between nutritional treatments (Table 3). A total of
42
43 310 115 embryos (HL group, $n = 49$; SL group, $n = 66$) were studied. The mean embryonic
44
45 311 viability rate at recovery time, evaluated by morphological criteria, was lower in the HL-fed
46
47 312 rabbit does than in the SL-fed group ($P < 0.005$). The HL group also presented a higher
48
49 313 number of retarded embryos ($P < 0.05$) compared to the SL group. The percentage of
50
51 314 unfertilized oocytes and degenerated embryos recovered were similar in both nutritional
52
53 315 groups, as well as mean embryo survival after IVC.
54
55
56

57 316
58
59 317 *3.4. Conception rate*
60

318

As depicted in Table 3, the average fertility achieved in primiparous does was not significantly different for both nutritional groups.

321

3.5. Feed intake

Digestible energy (DE) of HL diet (Table 4) was lower than in the SL diet ($P < 0.005$). Does receiving HL diet showed a significantly higher feed intake during pregnancy ($P < 0.05$) than those fed with SL diet. A similar feed intake was observed at the beginning of the first lactation in both groups.

327

3.6. Metabolic parameters

329

Does fed with rearing diets did not show significant differences in metabolic parameters neither at parturition nor at day 11 *pp* (Fig. 4). Throughout the *pp* period, serum NEFA concentrations significantly decreased from parturition time to day 11 *pp* in both nutritional groups (HL, $P < 0.005$, and SL, $P < 0.05$), whereas the opposite situation was observed for serum protein (HL, $P < 0.001$, and SL, $P < 0.005$) and leptin ($P < 0.05$) concentrations.

335

3.7. Live body weight and body composition

337

Does live body weight (LBW) and estimated body composition are displayed in Table 5. There were no significant differences in LBW and estimated body composition neither at parturition nor at day of AI between nutritional groups. Live body weight did not increase in the early *pp* period. Regarding body composition, water content was significantly lower on day 11 *pp* ($P < 0.005$), whereas body protein ($P < 0.005$), lipid depots ($P < 0.005$) and energy content

($P < 0.005$) were significantly higher on day 11 *pp* compared to parturition time in both nutritional groups.

4. Discussion

In commercial farms there is a need to improve the energy balance in high-yield primiparous lactating does to enhance their reproductive outcome. In this sense, the present work provides some reproductive, endocrine, and metabolic physiological basis when nutritional management includes highly-lignified products in the rearing period. This diet does not seem to enhance effectively reproductive physiology, energy intake or metabolic status of primiparous does in the subsequent *postpartum* period.

Controversial results have been described in the literature about the relationship between nutrition and their reproductive consequences. It has been reported that modifications in the composition of the pre-mating diet (high-fibre vs. high-starch diets) lead to high *in vitro* developmental oocyte rate in animals fed with the fibre diet (cattle: Mc Evoy et al., 1997; gilt: Ferguson et al., 2006). Besides, long-term effect of feeding strategies has also been evidenced on reproductive function in gilts (Cia et al., 1998) and embryo quality in heifers (Mantovani et al., 1993). In contrast, some works have shown no nutritional differences in ultrastructural oocyte morphology (O’Callaghan et al., 2000) and oocyte quality (Yaakub et al., 1999; Rizos et al., 2008; Arias-Álvarez et al., 2009). The impact of nutrition on follicle-enclosed oocytes and consequently on embryo survival (Zak et al., 1997; Ashworth et al., 1999; Lozano et al., 2003; Lonergan et al., 2006) could be mediated by changes in some metabolic and endocrine parameters (Fortun-Lamothe, 2006; Chagas et al., 2007). Cia et al. (1998) showed that reproductive performance can be affected by reduction in body protein mass, since alterations

in *in vitro* amino acid concentration influences cytoplasmic maturation (Hong and Lee, 2007). In addition, high NEFA concentrations seem to increase apoptosis in granulosa cells *in vitro* (Vanholder et al., 2005) and reduce the developmental potential of bovine oocytes (Leroy et al., 2005), reflecting the detrimental effect of negative energy balance on reproduction (Walters et al., 2002). Body lipid composition and feed intake could be also reflected by modifications in serum leptin concentrations. In turn, this hormone may modulate both hypothalamus-pituitary axis (Brecchia et al., 2006) and some aspects of ovarian physiology, such as follicular development (Brannian et al., 2002) and oocyte quality (Ryan et al., 2002; Kun et al., 2007; Van Tol et al., 2008).

In present study, serum metabolic parameters, E₂ and P₄ concentrations, antral follicular population or ovulation rate did not seem to be affected by rearing diet. However, *in vitro*-matured oocytes from the group fed with HL diet showed a decrease in nuclear maturation rate and a higher number of oocytes with abnormal migration of cortical granules (considered as degenerated or with reduced quality). This finding is in line with the increased levels of follicular atresia of the HL group. Since follicular cells and oocytes are strongly coordinated and mutually dependent, certain follicular events, such as atresia, are thought to be related to oocyte quality (Mermillod et al., 2008). Ovarian follicular atresia is related to follicular health and associated with the apoptotic cell death of mainly granulosa cells (Tilly et al., 1991; Maillet et al., 2002; Hutt et al., 2006).

In agreement with our findings regarding follicular atresia and oocyte maturation, viable embryo rate at recovery time in the HL group was lower than in the SL group. In this sense, the developmental competence of the oocyte and the steroidogenic capacity of the preovulatory follicle, as well as the subsequent corpus luteum, seem to be determined by their

393 endocrine and metabolic environment even during the long period prior to ovulation (Britt,
394 1992). Therefore, oviduct microenvironment can be affected in the long term by nutrition and
395 influence normal embryo development (Boland et al., 2001; McEvoy et al., 2001), especially
396 when high-fibre diets are supplied (Adamiak et al., 2006; Ferguson et al., 2006; 2007). These
397 results led us to hypothesize that, 1) although oocyte cortical granule migration rate was
398 similar in both nutritional groups, SL diet could be affecting other cytoplasmic mechanisms
399 associated to oocyte quality that guarantee the higher survival of the early embryo prior to
400 embryonic genome activation, and 2) there could be other metabolic and endocrine factors did
401 not measured in this study mediating the negative long-term nutritional effect of the HL diet
402 on follicular and oviduct environment. Thus, when good morphological embryos were IVC in
403 the same culture medium, *in vitro* developmental rate was similar in both groups. This result
404 is in agreement with observations reported in pigs fed with different rearing (Le Cozler et al.,
405 1998) or pre-mating diets (Novak et al., 2003).

407 In the present work we found no differences between nutritional groups in serum leptin, as
408 well as in NEFA and protein concentrations on day 11 *pp*. This agrees with the lack of
409 differences in body lipid energy and protein contents in such time point and the comparable
410 feed intake during early lactation as reported by others (Delavaud et al., 2002; Ferguson et al.,
411 2003; Chilliard et al., 2005). On the other hand, during first gestation, energy and protein
412 requirements for the development of the gravid uterus and foetuses are increased (Young,
413 1979; Fortun-Lamothe, 2006). As a consequence, in this study, NEFA concentrations were
414 higher at parturition than at day 11 *pp* in both nutritional groups; however, serum leptin and
415 protein concentrations were enhanced at day 11 *pp* in contrast to the results observed in cattle
416 (Leroy et al., 2005) but in agreement to previous reports in rabbits (Fortun, 1994).
417 Consistently, we observed lower body lipid depot, energy and protein content at parturition

time compared to day 11 *pp*. HL diet did not improve enough the energy balance and reproductive physiology in early *postpartum* period, giving rise to similar rates of fertility between groups, according to previous results published by our group (Rebollar et al., 2006). This results support the knowledge about the relationship between body reserve status of high-yield females and their reproductive success (Butler and Smith, 1989; Fortun-Lamothe, 2006; Lucy, 2007). Thus, further studies are required to establish how feeding strategies modify nutritional and metabolic factors affecting oocyte and embryo quality, even during post-implantation period.

Finally, the highly-lignified diet used as a feeding strategy to improve nutrient intake in high-yield rabbit does increased feed intake during pregnancy according to previous reports (Gidenne and Pérez, 1994; García et al., 1999; Nicodemus et al., 1999; Gidenne, 2003). This is probably due to the lower digestible energy and the higher transit speed of the HL diet, which may have induced a compensatory high feed intake during this period. However, later on, in the early lactation, feed intake of the same commercial lactating diet was not improved in the HL group, and it did not reduce lactation energy deficit contrarily to the findings reported by other authors (Nizza et al., 1997; Xiccato et al., 1999; Pascual et al., 2002). This is reflected in the similar metabolic parameters, LBW and estimated body composition observed in both nutritional groups in the early *postpartum* period.

In conclusion, the impact on follicular health, oocyte competence and early embryo development of a high-lignin-based diet during the rearing period does not lead to a reproductive physiology enhancement in primiparous rabbit does. In addition, it does not enhance feed intake during lactation, metabolic status or body composition, although changes in these parameters were observed throughout the *postpartum* period studied. This is the first

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

study that approaches the possible mechanisms mediating the nutritional and metabolic effect of nutrition on follicular, oocyte and embryo parameters in primiparous lactating rabbit does. Future insights are required to find the most favourable management strategies based on the understanding of the reproductive physiology of these animals.

Acknowledgements

This work was supported by MEC projects AGL07-60168, PR1/07-14906 and UCM research program (920249). MAA has been granted by CM and FSE, and RMGG was supported by the “Juan de la Cierva” MEC Program. The authors wish to thank P. Bermejo-Álvarez and M. Cuadrado for their invaluable support in the experimental part of this work.

References

Adamiak SJ, Powell K, Rooke JA, Webb R, Sinclair, KD, 2006: Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 131 247–258.

Alvariño JMR, Del Arco JA, Bueno A, 1998: Effect of mother–litter separation on reproductive performance of lactating rabbit females inseminated on day 4 or 11 post partum. *World Rabbit Sci.* 6 191-194.

Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Lorenzo PL, 2007a: Desarrollo folicular en la coneja. *ITEA* 103 1-13.

Arias-Álvarez M, López-Béjar M, Rebollar PG, García-García RM, Lorenzo PL, 2007b: Nuclear and cytoplasmic patterns of rabbit. IVM oocytes. *ITEA* 28 42-44.

- 466 Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Nicodemus N, Revuelta L, Millán P,
467 Lorenzo PL, 2009: Effects of a lignin-rich fibre diet on productive, reproductive and
468 endocrine parameters in nulliparous rabbit does. *Livest. Sci.* 123 107-115.
- 469 Ashworth CJ, Antipatis C, Beattie L, 1999: Effects of pre-and post-mating nutritional status
470 on hepatic function, progesterone concentration, uterine protein secretion and embryo survival
471 in Meishan pigs. *Reprod. Fertil. Dev.* 11 67-73.
- 472 Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, 2000: Official Methods of
473 Analysis of AOAC International, 17th Ed. Gaithersburg MD, USA.
- 474 Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D, 2001: Effect of nutrition on endocrine parameters,
475 ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55 1323-40.
- 476 Boletín Oficial del Estado (BOE), 2005: Real Decreto 1201/2005 Sobre protección de los
477 animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. B.O.E. 252 34367-34391.
- 478 Brannian JD, Hansen KA, 2002: Leptin and ovarian folliculogenesis: implications for
479 ovulation induction and ART outcomes. *Semin. Reprod. Med.* 20(2) 103-12.
- 480 Brecchia G, Bonanno A, Galeati G, Federici G, Maranesi M, Gobetti A, Zerani M, Boiti C,
481 2006: Hormonal and metabolic adaptation to fasting: effects on the hipotalamic-pituitary-
482 ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. *Domest. Anim. Endocrinol.* 31
483 105-122.
- 484 Britt JH, 1992: Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and
485 fertility. *Bovine Proc.* 24 39-43.
- 486 Butler WR, Smith D, 1989: Interrelationships between energy balance and postpartum
487 reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 72 767-783.
- 488 Chagas LM, Bass JJ, Blache D, Burke CR, Kay JK, Lindsay DR, Lucy MC, Martin GB,
489 Meier S, Rhodes FM, Roche JR, Thatcher WW, Webb R, 2007: New perspectives on the roles

- 490 of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J. Dairy*
491 *Sci.* 90(9) 4022-32.
- 492 Chilliard Y, Delavaud C, Bonnet M, 2005: Leptin expression in ruminants: Nutritional and
493 physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29
494 3–22.
- 495 Cia MC, Edwards SA, Glasgow VL, Shanks M, Fraser H, 1998: Modification of body
496 composition by altering the dietary lysine to energy ratio during rearing and the effect on
497 reproductive performance of gilts. *Anim. Sci.* 66 457-463.
- 498 De Blas C, García J, Carabaño R, 1999: Role of fibre in rabbit diets. A review. *Ann. Zootech.*
499 48 3-13.
- 500 Delavaud C, Ferlay A, Faulconnier Y, Bocquier F, Kann G, Chilliard Y, 2002: Plasma leptin
501 concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J.*
502 *Anim. Sci.* 80 1317-1328.
- 503 Depoortere I, Thijs T, Keith J Jr, Peeters TL, 2004: Treatment with interleukin-11 affects
504 plasma leptin levels in inflamed and non-inflamed rabbits. *Regul. Pept.* 15 149-156.
- 505 Ferguson EM, Ashworth CJ, Edwards SA, Hawkins N, Hepburn N, Hunter MG, 2003: Effect
506 of different nutritional regimens before ovulation on plasma concentrations of metabolic and
507 reproductive hormones and oocyte maturation in gilts. *Reproduction* 126 61-71.
- 508 Ferguson EM, Slevin J, Edwards SA, Hunter MG, Ashworth CJ, 2006: Effect of alterations in
509 the quantity and composition of the pre-mating diet on embryo survival and foetal growth in
510 the pig. *Anim. Reprod. Sci.* 96 89–103.
- 511 Ferguson EM, Slevin J, Hunter MG, Edwards SA, Ashworth CJ, 2007: Beneficial effects of a
512 high fibre diet on oocyte maturity and embryo survival. *Reproduction* 133 433-439.
- 513 Fortun L, 1994: Influence of progesterone supplementation on foetal survival in concurrently
514 pregnant and lactating rabbit does, *Reprod. Nutr. Dev.* 34 125–131.

- 515 Fortun-Lamothe L, 2006: Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Anim.*
516 *Reprod. Sci.* 93 1-15.
- 517 García J, Carabaño R, De Blas JC, 1999: Effect of fiber source on cell wall digestibility and
518 rate of passage in rabbits. *J. Anim. Sci.* 77 898-905.
- 519 García-García RM, Arias-Alvarez M, Rebollar PG, Revuelta L, Lorenzo PL, 2008: Influence
520 of different reproductive rhythms on serum estradiol, testosterone levels, features of follicular
521 population and atresia rate, and oocyte maturation in controlled suckling rabbits. *Anim.*
522 *Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci. 2008.10.007
- 523 Gidenne T, Perez JM, 1994: Apports de lignines et alimentation du lapin en croissance. I.
524 Conséquences sur la digestion et le transit. *Ann. Zootech.* 43 313-322.
- 525 Gidenne T, 2003: Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of
526 low-digested and digestible fibre. *Livest. Prod. Sci.* 81 105-117.
- 527 Hong J, Lee E, 2007: Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in
528 a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation
529 development. *Theriogenology*, 68 728-735.
- 530 Hutt, K.J., McLaughlin, E.A., Holland, M.K., 2006. Primordial follicle activation and
531 follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell Tissue Res.* 326, 809-822.
- 532 Kasuya K, 1995: The process of apoptosis in follicular epithelial cells in the rabbit ovary,
533 with special reference to involvement by macrophages. *Arch. Histol. Cytol.* 58 257-64.
- 534 Kun Z, Shaohua W, Yufang M, Yankun L, Hengxi W, Xiuzhu S, Yonghui Z, Yan L, Yunping
535 D, Lei Z, Ning L, 2007: Effects of leptin supplementation in in vitro maturation medium on
536 meiotic maturation of oocytes and preimplantation development of parthenogenetic and
537 cloned embryos in pigs. *Anim. Reprod. Sci.* 101 85-96.
- 538 Le Cozler Y, David C, Beaumal V, Hulin JC, Neil M, Dourmad JY, 1998: Effect of the
539 feeding level during rearing on performance of Large White gilts. Part 1: Growth,

- reproductive performance and feed intake during the first lactation. *Reprod. Nutr. Dev.* *38*(4) 363-75.
- Leroy JLMR, Vanholder T, Mateusen B, Christophe A, Opsomer G, Kruif A, Genicot G, Van Soom A, 2005: Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* *130* 485-495.
- Leroy JLMR, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IGF, Bols PEJ, 2008: Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod. Dom. Anim.* *43* 612-22.
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC, 2006: Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* *65* 137-52.
- Lorenzo PL, Illera JC, Silvan G, Munro CJ, Illera MJ, Illera M, 1997: Steroid-level response to insulin-like growth factor-1 in oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Immunol.* *35* 11-29.
- Lozano JM, Lonergan P, Boland MP, O'Callaghan D, 2003: Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction* *125* 543-553.
- Lucy MC, 2007: Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Reproduction* *64* 227-254.
- Maillet G, Bréard E, Benhaïm A, Leymarie P, Féral C, 2002: Hormonal regulation of apoptosis in rabbit granulosa cells in vitro: evaluation by flow cytometric detection of plasma membrane phosphatidylserine externalization. *Reproduction* *123* 243-51.
- Mantovani R, Enright WJ, Keane MG, Roche JF, Boland MP, 1993: Effect of nutrition and dose of follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. *Proc. AETE 9th Scientific meeting* 234.

- 1
2
3 565 McEvoy TG, Sinclair KD, Staines ME, Robinson JJ, Armstrong DG, Webb R, 1997: In vitro
4
5 566 blastocyst production in relation to energy and protein intake prior to oocyte collection. J.
6
7 567 Reprod. Cadem. Abstr. Ser. 19 132.
8
9
10 568 McEvoy TG, Robinson JJ, Sinclair KD, 2001: Developmental consequences of embryo and
11
12 569 cell manipulation in mice and farm animals. Reproduction. 22(4) 507-18.
13
14
15 570 Mermillod P, Dalbiès-Tran R, Uzbekova S, Thélie A, Traverso JM, Perreau C, Papillier P,
16
17 571 Monget P, 2008: Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? Reprod.
18
19 572 Domest. Anim. 43 393-400.
20
21
22 573 Mertens DR, 2002: Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in
23
24 574 feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study. J. Assoc. Off Assoc. Chem. Int.
25
26 575 85 1217-1240.
27
28
29 576 Nicodemus N, Carabaño R, Gracia J, Méndez J, De Blas C, 1999: Performance response of
30
31 577 lactating and growing rabbits to dietary lignin content. Anim. Feed. Sci. Technol. 80 43-54.
32
33
34 578 Nizza A, Dimeo C, Esposito L, 1997: Influence of the diet used before and after the first
35
36 579 mating on reproductive performance of rabbit does. World Rabbit Sci. 5 107-110.
37
38
39 580 Novak S, Almeida FRCL, Cosgrove JR, Doxon WT, Foxcroft GR, 2003: Effect of pre- and
40
41 581 post mating nutritional manipulation on plasma progesterone, blastocyst development, and
42
43 582 the oviductal environment during early pregnancy in gilts. J. Anim. Sci. 81 772-783.
44
45
46 583 O'Callaghan D, Yaakub H, Hyttel P, Spicer LJ, Boland MP, 2000: Effect of nutrition and
47
48 584 superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone
49
50 585 concentrations in ewes. J. Reprod. Fertil. 118 303-313.
51
52
53 586 Parigi-Bini R, Xiccato G, Cinetto M, Dalle-zotte A, 1992: Energy and protein utilization and
54
55 587 partition in rabbit does concurrently pregnant and lactating. Anim. Prod. 55 153-162.
56
57
58 588 Pascual JJ, Cervera C, Fernández-Carmona J, 2002: A feeding program for young rabbit does
59
60 589 based on all lucerne diets. World Rabbit Sci. 10 7-13.

1
2
3 590 Pascual JJ, Cervera C, Blas E, Fernandez-Carmon J, 2003: High energy diets for reproductive
4
5 591 rabbit does: effect of energy source. Nutrition Abstracts and Reviews Series B: Livestock
6
7 592 Feeds and Feeding 73(5) 27R-39R.
8
9
10 593 Pereda N, Rebollar PG, Schwarz BF, Arias-Alvarez M, Revuelta L, Lorenzo PL, Nicodemus
11
12 594 N, 2007: Estudio de la composición corporal de conejas reproductoras mediante la técnica de
13
14 595 Impedancia Bioeléctrica (BIA). Parte II: Ecuaciones de Predicción. II Congreso Ibérico de
15
16 596 Cunicultura, Vila Real, Portugal 17-20.
17
18 597 Pérez JM, Lebas F, Gidenne T, Maertens L, Xiccato G, Parigi-Bini R, Dalle Zotte A, Cossu
19
20 598 ME, Carazzolo A, Villamide MJ, Carabaño R, Fraga MJ, Ramos MA, Cervera C, Blas E,
21
22 599 Fernández J, Falcao E, Cunha L, Bengala Freire J, 1995: European reference method for in
23
24 600 vitro determination of diet digestibility in rabbits. World Rabbit Sci. 3 41-43.
25
26
27 601 Rebollar PG, Milanés A, Pereda N, Millán P, Cano P, Esquifino AI, Villarroel M, Silván G,
28
29 602 Lorenzo PL, 2006: Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe-litter
30
31 603 separation or eCG injection: reproductive parameters and endocrine profiles. Anim. Reprod.
32
33 604 Sci. 93 218-230.
34
35
36 605 Rebollar PG, Bonanno A, Di Grigoli A, Tornambè G, Lorenzo PL, 2008: Endocrine and
37
38 606 ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit
39
40 607 does. Anim. Reprod. Sci. 104 316-328.
41
42
43 608 Rizos D, Kenny DA, Griffin W, Quinn KM, Duffy P, Mulligan FJ, Roche JF, Boland MP,
44
45 609 Lonergan P, 2008: The effect of feeding propylene glycol to dairy cows during the early
46
47 610 postpartum period on follicular dynamics and on metabolic parameters related to fertility.
48
49 611 Theriogenology 69 688-99.
50
51 612 Ryan NK, Woodhouse CM, Van der Hoek KH, Gilchrist RB, Armstrong DT, Norman RJ,
52
53 613 2002: Expression of leptin and its receptor in the murine ovary: possible role in the regulation
54
55 614 of oocyte maturation. Biol. Reprod. 66 1548-54.
56
57
58
59
60

- 1
2
3 615 Tietz NW, 1995: Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd Edition, Philadelphia.
4
5
6 616 Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ, 1991: Involvement of apoptosis in ovarian
7
8 617 follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129(5) 2799-801.
9
10 618 Vanholder T, Leroy JLMR, Van Soom A, Opsomer G, Maes D, Coryn M, de Kruif A, 2005:
11
12 619 Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation
13
14 620 in vitro. *Animal Reproduction Science*, 87 33-44.
15
16
17 621 Van Soest JP, Robertson JB, Lewis BA, 1991: Methods for dietary fiber, neutral detergent
18
19 622 fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy. Sci.* 74 3583-
20
21 623 3597.
22
23
24 624 Van tol HTA, Van Eerdenburg F, Colenbrander B, Roelen BAJ, 2008: Enhancement of
25
26 625 bovine oocyte maturation by leptin is accompanied by an upregulation in mRNA expression
27
28 626 of leptin receptor isoforms in cumulus cells. *Mol. Reprod. Dev.* 75 578–587.
29
30
31 627 Walters AH, Bailey TL, Pearson RE, Gwazdauskas FC, 2002: Parity-Related changes in
32
33 628 bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum.
34
35 629 *J. Dairy Sci.* 85 824-832.
36
37
38 630 Xiccato G, Bernardini M, Castellini C, Dalle Zotte A, Queaque PI, Trocino A, 1999: Effect of
39
40 631 post-weaning feeding on the performance and energy balance of female rabbits at different
41
42 632 physiological states. *J. Anim. Sci.* 77 416-426.
43
44
45 633 Yaakub H, O'Callaghan D, Boland MP, 1999: Effect of type and quantity of concentrates on
46
47 634 superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology* 51(7) 1259-66.
48
49
50 635 Young VR, 1979: Diet as a modulator of aging and longevity. *Federation Proceedings* 38(6)
51
52 636 1994-2000.
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

637 Zak LJ, Xu X, Hardin RT, Foxcroft GR, 1997: Impact of different patterns of feed intake
638 during lactation in the primiparous sow on follicular development and oocyte maturation. J.
639 Reprod. Fertil. *110(1)* 99-106.

For Peer Review

640 **Figure captions**

641 Figure 1. Schematic representation of the experimental design. AI: artificial insemination;
642 dpp: days *postpartum*; *: euthanasia.

643
644 Figure 2. Follicular apoptosis measured by TUNEL assessment in ovarian sections of
645 primiparous rabbit does at insemination time (day 11 *postpartum*). a) Control section showing
646 ovarian cells stained with DAPI (40x); b) Only follicular apoptotic cells are labeled (40x).

647
648 Figure 3. Cytoplasmic oocyte maturation related to cortical granule (CG) migration: a)
649 Peripheral CG distribution; b) Cortical CG distribution; c) Homogeneous CG distribution;
650 d) Non-homogeneous or abnormal CG distribution. Oocyte diameter is around 80 μm .

651
652 Figure 4. Serum metabolic parameters from parturition until insemination (day 11 *pp*) in
653 rabbit primiparous does fed with different diets (HL and SL) during the rearing period.
654 Different letters in the same column (a,b), (c,d) and (e,f) indicate significant differences ($P <$
655 0.05), ($P < 0.005$) and ($P < 0.001$), respectively.

Figure captions

Figure 1. Schematic representation of the experimental design. AI: artificial insemination; dpp: days *postpartum*; *: euthanasia.

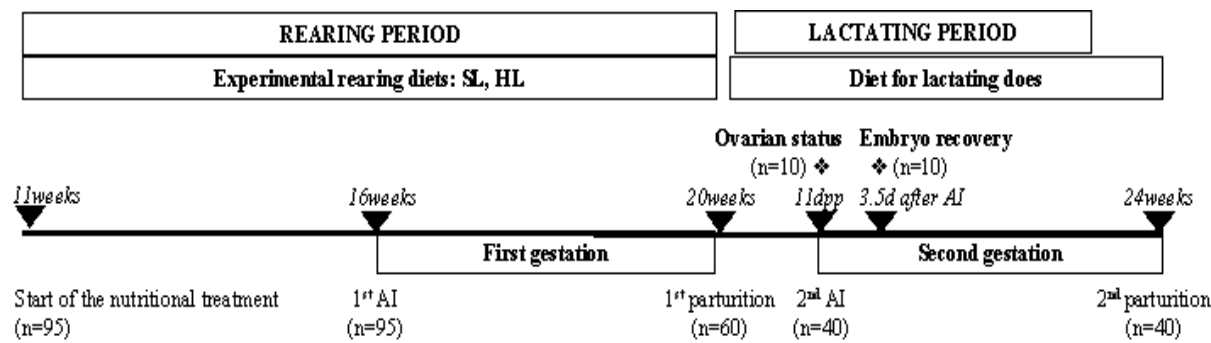


Figure 2. Follicular apoptosis measured by TUNEL in ovarian sections of primiparous rabbit does at insemination time (day 11 *postpartum*). a) Control section showing ovarian cells stained with DAPI (40x); b) Only follicular apoptotic cells are labeled (40x).

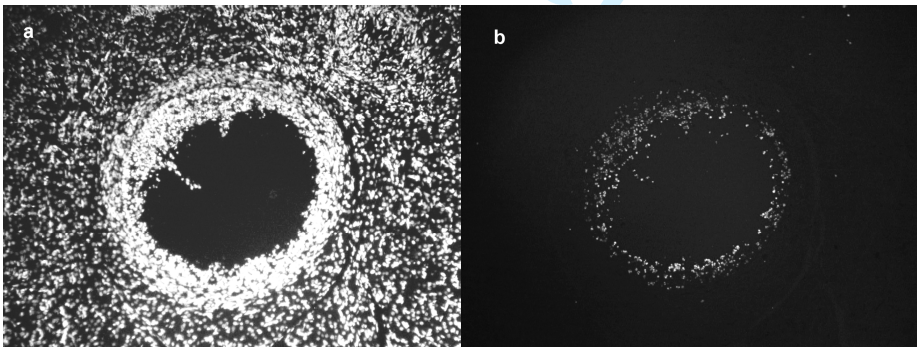


Figure 3. Cytoplasmic oocyte maturation related to cortical granule (CG) migration: a) Peripheral CG distribution; b) Cortical CG distribution; c) Homogeneous CG distribution; d) Non-homogeneous or abnormal CG distribution. Oocyte diameter is around 80 μm .

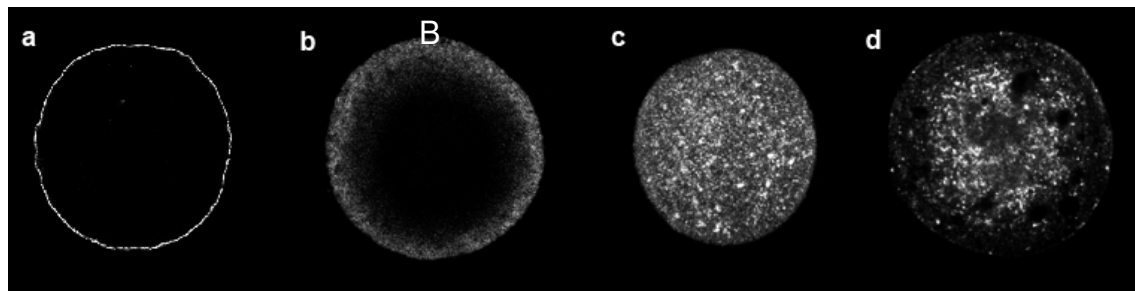
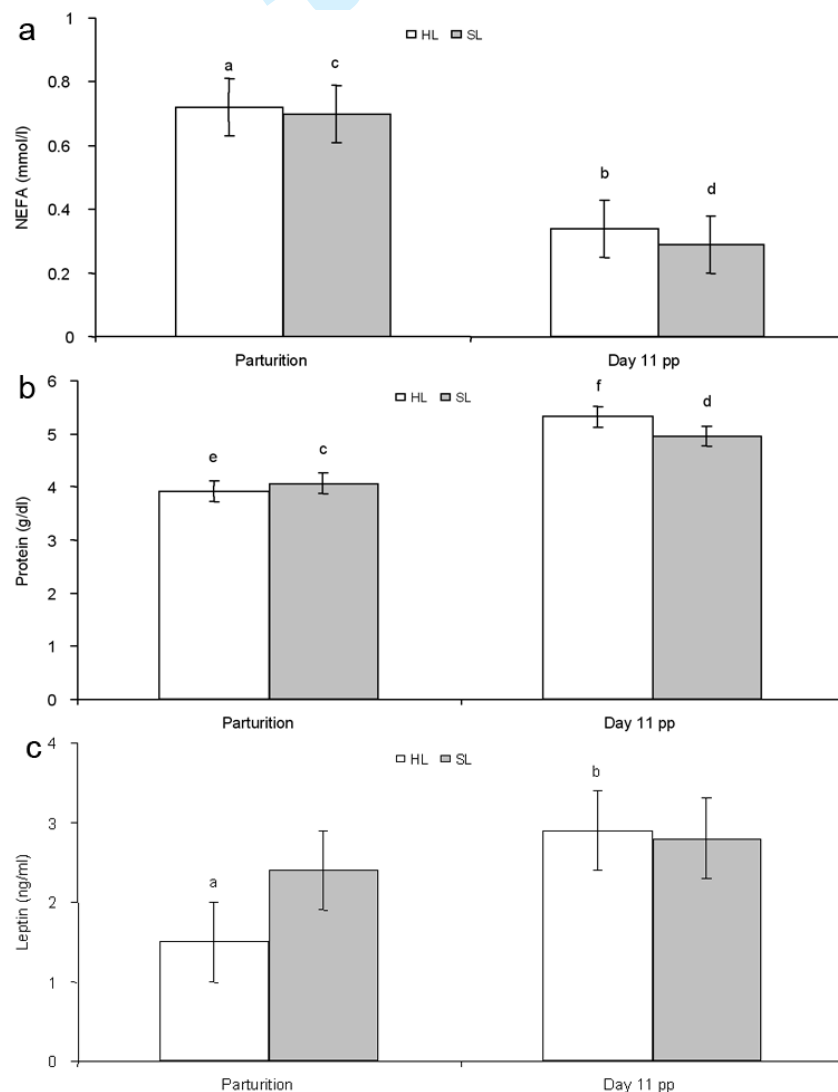


Figure 4. Serum metabolic parameters from parturition until insemination (day 11 *pp*) in rabbit primiparous does fed with different diets (HL and SL) during the rearing period. Different letters in the same column (a,b), (c,d) and (e,f) indicate significant differences ($P < 0.05$), ($P < 0.005$) and ($P < 0.001$), respectively.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

26 Table 1. Ingredients and chemical composition of rearing diets [Dry Matter (DM) %].

	Rearing diets	
	SL	HL
Ingredients (%)		
Lucerne hay	28.0	50.0
Defatted grape seed meal	0.0	19.0
Wheat	10.0	10.0
Wheat bran	12.5	12.5
Sugarbeet pulp	14.0	0.0
Straw	22.0	0.0
Sunflower 30%	7.4	7.4
Soybean 44%	5.0	0.0
L- Threonine	< 0.1	< 0.1
Calcium Carbonate	0.3	0.3
Salt	0.5	0.5
Zinc Bacitracin	0.2	0.2
Corrector ⁽¹⁾	0.2	0.2
Chemical analysis (DM %)		
Dry matter	90.6	90.5
Ash	8.2	8.6
Crude Protein	16.8	16.6
Starch	17.9	8.9
Acid Detergent Fibre	20.3	33.9
Neutro Detergent Fibre	40.9	49.6
Acid Detergent Lignin	4.9	15.8

Ether Extract	3.1	3.3
Energy (MJ/Kg)	18.2	18.5

27

(¹) Provided by DSM Nutritional Products Iberia, S.A. Mineral and vitamin composition (mg/kg of complete diet): Mn: 15; Zn: 50; I: 0.8; Fe: 40; Cu: 8; Co: 0.30; Se: 0.05.; riboflavin: 3; calcium d-pantothenate: 10; nicotinic acid: 25; menadione: 1; α -tocopherol: 35; thiamine: 1; pyridoxine: 1.5; biotin: 0.05; folic acid: 1.5; cyanocobalamin: 0.012; robenidine: 50; vitamin A: 10,000 IU/kg; vitamin D3: 900 IU/kg.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 2. Ovarian status of primiparous rabbit does, previous artificial insemination (day 11 *postpartum*), and fed during rearing period with different diets.

Rearing diets			
	SL	HL	P
Ovary weight/ doe (mg)	329.9 ± 19.1	360.6 ± 22.7	NS
Oestradiol 17β (pg/ml)	21.6 ± 1.9	19.3 ± 1.7	NS
Progesterone (ng/ml)	3.6 ± 1.4	4.4 ± 1.7	NS
Follicular population/ ovary			
Preovulatory follicles	10.5 ± 1.9	11.2 ± 1.2	NS
Antral follicles	8.7 ± 1.9	10.0 ± 2.7	NS
Secondary follicles	3.8 ± 0.8	3.3 ± 0.3	NS
Primary follicles	10.6 ± 5.0	5.0 ± 1.5	NS
Primordial follicles	58.7 ± 16.9	47.1 ± 7.1	NS
Follicular apoptosis rate/ ovary (%)	20.8 ± 3.0	35.1 ± 6.7	0.001
Oocyte maturation			
MII rate (%)	60.8 ± 6.9	29.1 ± 5.1	0.001
CG migration rate (%)			
Peripherycal distribution	16.3 ± 5.3	14.5 ± 3.8	NS
Cortical distribution	16.3 ± 5.3	18.1 ± 4.2	NS
Homogeneous distribution	42.9 ± 7.1	20.5 ± 4.4	0.04
Abnormal distribution	24.5 ± 6.2	47.0 ± 5.5	0.04

NS: not significant differences

Table 3. Ovulation rate, embryo yield 3.5 days post- insemination on day 11 *postpartum* and average fertility of primiparous rabbit does fed during rearing period with different diets.

	Rearing diets		
	SL	HL	P
Ovulation rate/ doe (n)	14.3 ± 1.3	14.1 ± 0.9	NS
Embryo yield (%)			
Embryo viability at recovery time	65.4 ± 5.9	44.9 ± 7.1	0.001
Unfertilized oocytes	30.3 ± 5.7	36.7 ± 6.9	NS
Embryo degeneneration	4.5 ± 2.5	2.0 ± 2.0	NS
Retarded embryos	3.0 ± 2.1	14.3 ± 5.0	0.04
Embryo viability after IVC	67.4 ± 7.2	77.3 ± 9.1	NS
Conception rate (%)	63.6 ± 11.4	58.3 ± 14.8	NS

NS: not significant differences

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 4. Digestible energy and feed intake during pregnancy and early lactation period (until insemination on day 11 *pp*) in rabbit primiparous does previously fed with different diets during rearing period.

Rearing diets			
	SL	HL	P
Digestible Energy (MJ/Kg) ⁽¹⁾	11.3 ± 0.1	9.3 ± 0.1	0.001
Feed intake (g/day)			
Pregnancy	156.0 ± 11.6	243.0 ± 11.4	0.04
Early <i>postpartum</i> period	267.3 ± 12.4	281.0 ± 12.7	NS

NS: not significant differences

⁽¹⁾ Digestible energy (DE) was determined in a faecal digestibility trial according to Perez et al. (1995)

Table 5. Live body weight and estimated body composition at parturition and insemination time (day 11 *pp*), in rabbit primiparous does previously fed with different diets during rearing period.

	Diet		Time		P		
	HL	SL	Parturition	Day 11 <i>pp</i>	P _{Diet}	P _{Time}	P _(DietXTime)
LBW (g)	3813.7 ± 3.9	3798.1 ± 3.9	3834.7 ± 3.9	3777.1 ± 3.9	NS	NS	NS
⁽¹⁾ Body							
Composition							
(%)							
Water	62.87 ± 0.2	62.39 ± 0.2	63.9 ± 0.2	61.3 ± 0.2	NS	0.001	NS
Ash	3.14 ± 0.05	3.14 ± 0.05	3.12 ± 0.05	3.16 ± 0.05	NS	NS	NS
Proteins	17.55 ± 0.1	17.68 ± 0.1	17.3 ± 0.1	17.9 ± 0.1	NS	0.001	NS
Lipids	13.22 ± 0.5	13.58 ± 0.5	12.5 ± 0.5	14.3 ± 0.5	NS	0.001	NS
Energy							
(KJ/100g)	1024.5 ± 2.5	1042.8 ± 2.5	986.4 ± 2.5	1080.9 ± 2.5	NS	0.001	NS

NS: not significant differences.

⁽¹⁾ Body composition was estimated using multiple regression equations as described by Pereda et al. (2007)

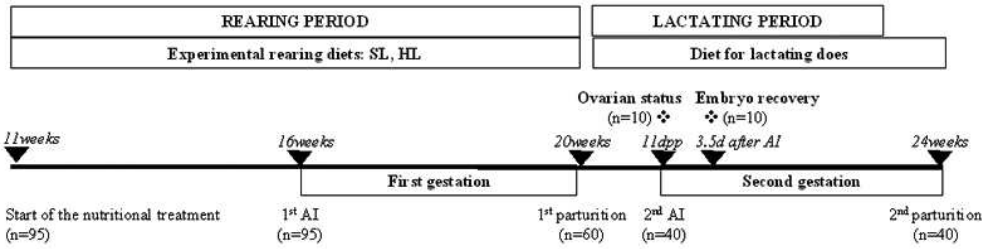


Figure 1.experimental design
210x65mm (96 x 96 DPI)

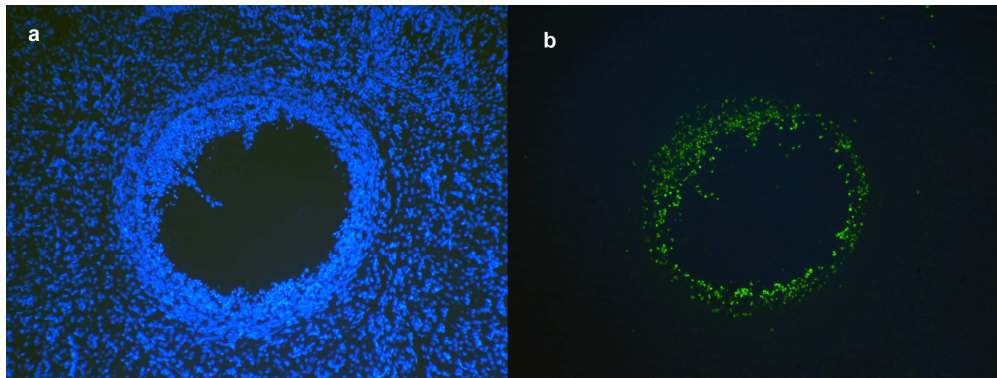


Figure 2. follicular apoptosis. TUNEL
980x366mm (72 x 72 DPI)

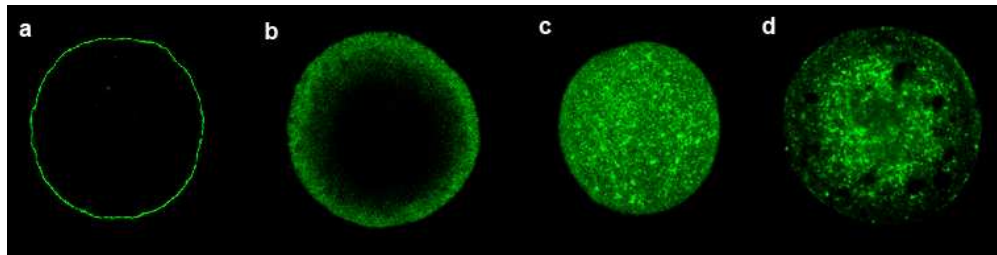


Figure 3. cortical granules. Confocal
268x67mm (72 x 72 DPI)

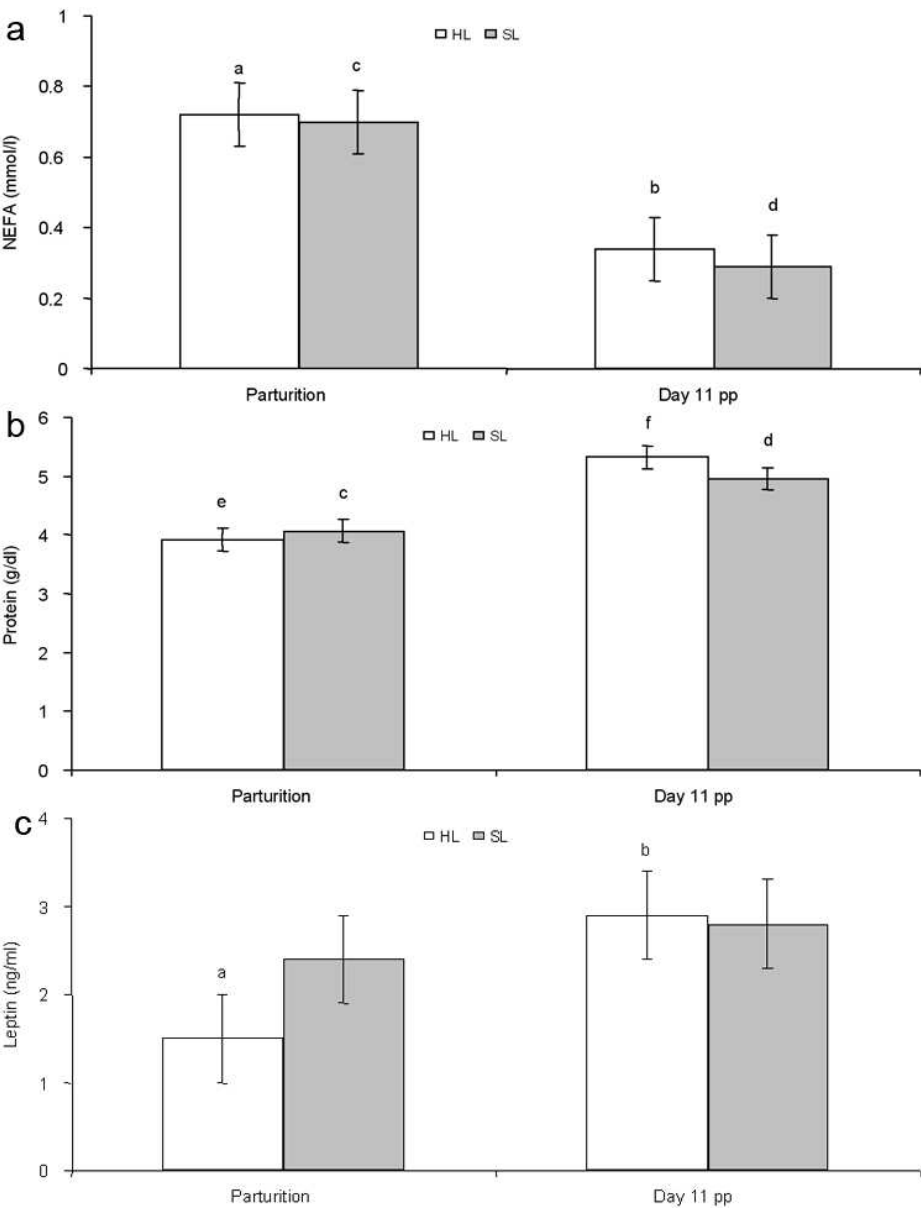


Figure 4. Metabolic parameters
99x129mm (190 x 190 DPI)

*CAPÍTULO 3: INFLUENCIA DE LA MRESERVA ENERGÉTICA
MEDIADA POR LA LEPTINA SOBRE EL PROCESO DE
MADURACIÓN IN VITRO DEL OOCITO DE LA CONEJA*

EXPERIMENTO 3. Inmunolocalización del receptor de la leptina en el ovario y estudio de la influencia de esta hormona sobre la maduración nuclear y citoplasmática, la secreción esteroidogénica de los complejos cúmulo-oocito, así como del mecanismo de acción intracelular a través de las vías de las MAPK (Mitogen–Activated Protein Kinases) y de las JAK/ STAT3 (Janus activated kinase/ Signal Transducer Activator for Transcription 3).

Influence of leptin on in vitro maturation and steroidogenic secretion of cumulus-oocyte complexes through MAPK and STAT pathways in the rabbit model.

4.5.2. Resumen

La leptina es una hormona cuyos niveles son indicativos de la reserva energética y de la grasa corporal de los individuos y actúa, a su vez, sobre la función reproductiva, en particular, modulando la calidad del oocito durante el periodo preovulatorio a través de la activación de diferentes mecanismos intracelulares de señalización. El objetivo del Experimento 4 fue: 1) constatar la presencia del receptor de la leptina (Ob-R) a nivel ovárico y, 2) estudiar el efecto de esta hormona sobre la maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos *in vitro* a través de dos posibles vías de señalización intracelular (MAPK y STAT3), así como determinar la respuesta esteroidogénica a la leptina de los complejos cúmulo-oocito *in vitro*, utilizando la coneja como modelo experimental (ver esquema del diseño experimental).

Los resultados del estudio mostraron la presencia del receptor de la leptina en el oocito, células del cúmulo, células de la granulosa y de la teca interna entre otras, aunque no se detectó en la células de la teca externa. La adición de leptina (1-100 ng/ mL) a los medios de cultivo en condiciones *in vitro* mejoró la maduración nuclear pero no la maduración citoplasmática, relacionada con la migración de los gránulos corticales. Tampoco modificó significativamente la respuesta esteroidogénica de los complejos cúmulo-oocito, aunque en todos los grupos se produjo un incremento en la secreción de estradiol y progesterona durante el periodo de maduración. En presencia de los inhibidores de las vías de señalización de las MAPK y de las STAT3, los oocitos madurados con leptina mostraron índices de maduración nuclear inferiores que aquéllos en los que no se incluyeron ambos inhibidores. La maduración nuclear no se modificó en ausencia de leptina. La tasa de maduración citoplasmática y la respuesta esteroidogénica no variaron significativamente cuando se incluyeron ambos inhibidores en los medios con o sin leptina.

Por lo tanto, los resultados de este estudio permiten concluir que la leptina ejerce un efecto beneficioso durante la maduración nuclear del oocito y que este efecto está mediado por la activación de las vías de las MAPK y de las STAT3. Sin embargo, esta hormona no parece ejercer ninguna influencia significativa sobre la migración de los gránulos corticales de los oocitos de coneja madurados *in vitro* ni sobre la capacidad esteroidogénica de los complejos cúmulo-oocito.

4.5.2. Diseño experimental

Los dos primeros experimentos fueron diseñados para determinar la inmunolocalización del receptor de la leptina (Ob-R) en el ovario de la coneja y la determinación del efecto de esta hormona sobre la maduración nuclear y citoplasmática *in vitro* de los oocitos de coneja. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ovarios de conejas adultas procedentes del matadero. Una vez inmunolocalizado el Ob-R en los diferentes compartimentos ováricos, en la etapa siguiente se obtuvieron los complejos cúmulo-oocito (COC) que se maduraron *in vitro* con diferentes concentraciones de leptina (ver esquema del diseño experimental). Se valoró:

- ❖ el grado de maduración meiótica alcanzado y la tasa de migración de los gránulos corticales mediante el estudio microscópico confocal.
- ❖ la secreción de estradiol y progesterona por parte de los COC, mediante el análisis de estas hormonas en el medio de cultivo.

Con el fin de evaluar la implicación de las posibles vías de señalización de la leptina por las que ejerce su acción biológica, mediadas por su receptor, se llevó a cabo un estudio en el cual se cultivaron los complejos cúmulo-oocito con o sin leptina añadiendo inhibidores de dos de las principales vías de señalización de esta hormona cuando se une a su receptor: inhibidores de la vía de las MAPK e inhibidores de la vía de las STAT3. En todos los grupos experimentales se determinó igualmente:

- ❖ el grado de maduración meiótica alcanzado y tasa de migración de los gránulos corticales mediante el estudio microscópico confocal.
- ❖ la secreción de estradiol y progesterona por parte de los COC, mediante el análisis de estas hormonas en el medio de cultivo.

A) Inmunolocalización del receptor de la leptina en el ovario



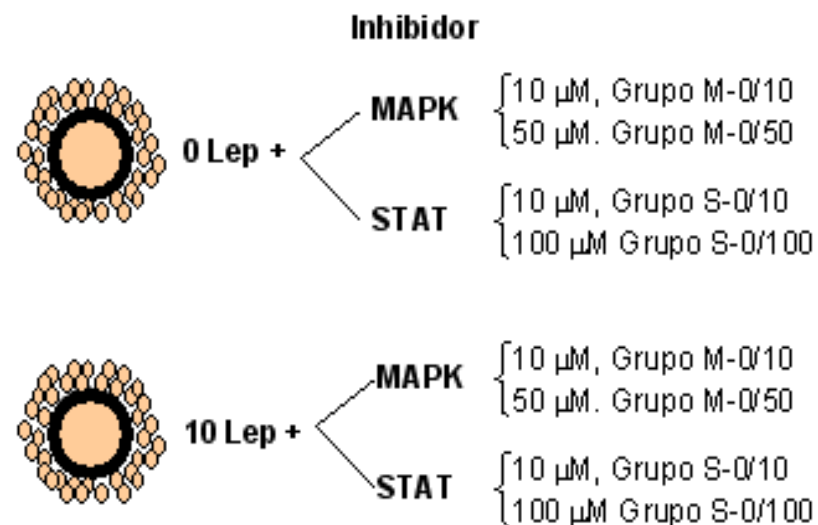
B) Maduración *in vitro* con diferentes concentraciones de leptina (ng/ mL)

0 Lep
1 Lep
10 Lep
100 Lep
10% FCS



Valoración del grado de maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos
Respuesta esteroidogénica de los COC

C) Maduración *in vitro* con y sin leptina e inhibidores de las vías de señalización



Valoración del grado de maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos
Respuesta esteroidogénica de los COC

Imagen 4.5. Representación esquemática del diseño correspondiente al Experimento 3 para determinar: A) la presencia del receptor de la leptina, B) el efecto de la leptina sobre la maduración *in vitro* de los oocitos de coneja y, C) las vías a través de las cuáles actúa la leptina mediante el uso de inhibidores de las MAPK y STAT3.

Influence of leptin on *in vitro* maturation and steroidogenic secretion of cumulus-oocyte complexes through MAPK and STAT pathways in the rabbit model

Arias-Álvarez M ¹; García- García RM ¹; Torres- Rovira L ²; González- Bulnes A ²; Rebollar PG ³; Lorenzo PL ^{1*}

¹ *Dpto. Fisiología (Fisiología Animal). Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Ciudad Universitaria, s/n, 28040, Madrid, Spain.*

² *Dpto. de Reproducción Animal y Conservación de Recursos Zoogenéticos, INIA. Avda. Puerta de Hierro s/n, 28040 Madrid. Spain.*

³ *Dpto. Producción Animal. ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria, s/n, 28040, Madrid, Spain.*

Short title: leptin pathways in rabbit oocyte model

*Correspondence should be addressed to Pedro L. Lorenzo: plorenzo@vet.ucm.es

Phone number: 00 34 913944093

Fax: 00 34 913943835

Abstract

Leptin reflects the amount of body fat and could acts as modulator of oocyte quality during preovulatory period through activation of specific transcription factors. The aim of this work was to establish if: 1) leptin influences on meiotic and cytoplasmic oocyte maturation; 2) mitogen-activated protein kinases (MAPK) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mediates leptin effect, and 4) if leptin modulates steroid secretion of cumulus-oocyte complexes (COC) during *in vitro* maturation (IVM) of rabbit oocytes. Also, we confirmed leptin receptor (ObR) was immunolocalized in oocytes, cumulus and granulosa cells. The confocal study showed that COC cultured with 1-100 ng/mL leptin showed significantly higher nuclear maturation rates (Metaphase II) than those *in vitro*-matured without leptin ($P<0.05$); and similar MII index to group supplemented with FCS. Leptin added at any concentration did not improve the percentage of oocytes cytoplasmically matured, in terms of cortical granule migration rate; excepting in FCS group, which also showed a significantly higher oestradiol secretion compared to 0, 1, 10 and 100 ng/mL leptin treatments ($P<0.001$). Progesterone concentrations in spent media were similar in all treatments. Leptin-stimulated nuclear oocyte maturation was significantly impaired when leptin-induced MAPK and STAT3 phosphorylation were suppressed by the specific MAPK (PD98059) and STAT3 (AG490) inhibitors at all concentrations studied ($P<0.001$). Steroid secretion of COC was not affected by leptin activation of MAPK or STAT proteins because of such steroids did not diminish in spent media when inhibitors were added. The results confirmed that the enhancement of meiotic oocyte maturation by leptin is mediated by activation of MAPK and STAT3 pathways, but it does not improve cytoplasmic oocyte maturation neither the steroidogenic response of cumulus-oocyte complexes in rabbit model.

Key words: leptin, oocyte maturation, MAPK, STAT3, oestradiol, progesterone, rabbit.

1. Introduction

Obesity is a rising health problem that is associated with infertility, and can impair the outcome of assisted reproductive technologies. Studies performed in infertile women and animals indicate that the ovary plays a leading role in the fertility prognosis (Bellver *et al.*, 2006). Different endocrine factors that reflect the body mass index, may affect oocyte quality and therefore the reproductive success. In this way, Leptin a 16-kDa peptide hormone encoded by the obese gene (*ob*) and secreted mainly by the adipose tissue reflects the amount of body fat (Zhang *et al.*, 1994). This hormone plays an important role in the regulation of food intake and energy expenditure and in the reproductive function (Cervero *et al.*, 2005). Mouse lacking either leptin (*ob/ob*) or the leptin receptors (*db/db*) are both obese and infertile (Zhang *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1996). The importance of leptin on reproductive function was tested when Chehab *et al.* (1996) showed that the administration of exogenous leptin to female *ob/ob* mouse had the ability to restore the fertility in these animals. Thus, elevated leptin concentrations, associated with obesity, may partly explain the negative impact of this pathology on fertility. Although, previous research also have demonstrated that a minimum level of leptin is required for maintenance of fertility in animals and humans (Cheung *et al.*, 1997).

The influence of this hormone on reproduction is mediated by the regulation of the hypothalamus-pituitary axis and the ovarian function through its receptor (Chehab *et al.*, 1996; Brechia *et al.* 2006). In the ovary, leptin receptor (ObR) has been detected in granulosa cells of follicles, cumulus and oocytes in several species (cattle: Paula-Lopes *et al.*, 2007; ewe: Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2005, human: Cioffi *et al.*, 1997; mouse: Antzack and Van Blerkom, 1997; pig: Craig *et al.*, 2004; rabbit: Zerani *et al.*, 2004; rat: Ryan *et al.*, 2002). The ObR, product of the diabetes gene (*db*), is a member of the class I cytokine receptor superfamily, with six known isoforms (Tartaglia *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996) that mediates the leptin signalling. Both the long (ObR_b) and short transmembrane isoforms (ObR_{a, c, d, f}) contain identical extracellular and transmembrane domain, but the cytoplasmic region is

different in length (Fruhbeck, 2006). ObR usually activates a cytoplasmic janus kinase 2 (Jak 2), to transmit leptin signals (Fruhbeck, 2006). The ObR_b is highly expressed in the hypothalamus and mediates the leptin signalling through activation of both the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and mitogen- activated protein kinases (MAPK) (Tartaglia *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996; Bjorbaek *et al.*, 1997). The short isoforms of the receptor are more widely expressed in the peripheral tissues and are capable of signalling through the MAPK pathway (Bjorbaek *et al.*, 1997; Tartaglia, 1997). Specially, MEK1 and MEK2 are dual-specific protein kinases that function in a MAPK cascade and appear as predominant MAPK in cumulus-oocyte complexes (COC) during *in vitro* maturation in heifers (Van Tol *et al.*, 2008). Although leptin may be integrated to a complex intracellular cross talk system that regulates the specifically cell-functions as cell growth, proliferation and differentiation in several cell types (Zhang *et al.*, 1994); the specific role of leptin through these pathways in the oocyte is little known (Matsuoka *et al.*, 1999; Craig *et al.*, 2004; Van Tol *et al.*, 2008).

Cumulus-oocyte complexes are capable to respond leptin during preovulatory period (Cioffi *et al.*, 1997). In this sense, very recent studies have focused on potential direct effects of leptin on oocyte maturation showing that it might acts as a modulator of the fertility potential of oocytes through activation of specific transcription factors in the oocyte (Matsuoka *et al.*, 1999; Craig *et al.*, 2004). Besides, interactions between leptin and cumulus cell-enclosed oocytes may result in activation of MAPK and STAT3 pathways that could modulate steroid production in cumulus cells and thus, indirectly, affect oocyte maturation process (Karamouti *et al.*, 2003; Ruiz-Cortes *et al.* 2003; Swain *et al.*, 2004). It has been reported that follicular cells control oocyte physiology by secreting steroids and *viceversa* (Mingotti *et al.*, 1995); acting on meiotic and on cytoplasmic maturation of mammalian oocytes by a paracrine or autocrine pathways (Kaji *et al.*, 1987; Younis *et al.*, 1989). Therefore, concentrations and relationship of oestradiol and progesterone during the periovulatory period are believed to be of biological consequence for normal nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in human (Andersen, 1993; Tesarik and Mendoza, 1997). The understanding of these mechanisms is

essential because, the influence of leptin on oocyte maturation has important implications for ovulation induction and assisted reproductive technologies in human infertility. However, elucidation of leptin's specific role in such process has been challenging, with conflicting results reported by several investigators.

Rabbit are widely used as an *in vitro* model in experimental procedures on mammalian oocytes and embryos. Taken together, all these findings worth important to investigate by the first time in the rabbit oocyte: 1) the direct role of different leptin concentrations during meiotic and cytoplasmic *in vitro* oocyte maturation; 2) the MAPK and STAT3- leptin-dependent intracellular mechanisms and; 3) the steroidogenic response of cumulus-oocyte complexes to leptin during the oocyte maturation process. Understanding the detailed mechanisms of leptin in oocyte maturation ability and quality will help to find optimal hormone combinations to apply in animal and human infertility therapy.

2. Materials and methods

Unless otherwise stated, all the chemicals were purchased from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA). All the experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Polytechnic University of Madrid (Spain), and were in compliance with the Spanish guidelines for the care and use of animals in research (BOE, 2005).

2.1. Immunohistochemistry of Leptin Receptor (ObR)

After slide deparaffinization and rehydration in graded alcohol, sections were heat-treated in sodium citrate solution (pH 6) to unmask antigen epitopes. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating the slides with 3 % v/v hydrogen peroxide in methanol solution for 30 minutes. Non-specific binding of immunoglobulins was blocked with normal goat serum (1:10, sc-2043, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) in phosphate buffer solution (PBS) at room temperature (RT) for 30 minutes. Primary antibody against ObR (1:10, sc-8391, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) was incubated overnight

at RT in a humidified chamber. The antibody used in this study specifically recognizes long and short forms of human ObR. In the negative control sections, incubation with primary antibody was replaced by PBS solution. After that, samples were incubated with biotinylated secondary antibody (1:200, biotinylated anti-mouse IgG (H+L) made in goat, Vector Laboratories, Ltd., Peterborough, UK) for 30 minutes, and subsequently with the avidin-biotin complex (ABC Vector Elite kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) at RT for 30 minutes. After chromogen incubation (Vector Nova RED substrate Kit for Peroxidase, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), sections were counterstained with haematoxylin, and photographed under a light microscope (Olympus BX40, Hamburg, Germany).

2.2. Oocyte collection and in vitro maturation

Ovaries of slaughtered adult animals were placed in PBS at 37 °C and were transported to the laboratory. Cumulus-oocyte complexes (COC) were obtained by aspiration with 2 ml syringe and 25 G needle from ovarian follicles ≥ 1 mm in size under a stereoscopic microscope. COC with compact cumulus were washed and placed in 500 μ l of maturation medium in four-well dishes (NuncloTM Surface, NuncTM, Roskilde, Demark) and cultured for 16 h at 38 °C under an atmosphere of 5 % CO₂ in air with maximum humidity.

To assess the influence of leptin on oocyte maturation process six replicates was done (n = 750 oocytes) (Fig. 1). The maturation medium consisted in tissue culture media (TCM-199) with 2 mM L-glutamine, 0.1 mg/ mL sodium pyruvate, 0.3 % bovine serum albumin (BSA) supplemented with: 0, 1, 10, or 100 ng/ mL leptin or 10 % v/v foetal calf serum (FCS) (named as 0 Lep, 1 Lep, 10 Lep, 100 Lep and FCS groups respectively).

2.3. Assessment of MAPK and STA3 leptin-mediated pathways during in vitro maturation

To assess if leptin acts on oocyte IVM activating MAPK and STAT3 pathways we have performed a dose- response study with five replicates (n = 578 oocytes: MAPK, n = 301 and STAT, n = 277). For maturation, COC were randomly divided into two groups (Fig. 1): control

(0 ng/ mL leptin: Group 0 Lep) or leptin group (10 ng/ mL leptin: Group 10 Lep). PD98059 [2-(2-amino-3-methoxyphenyl)-4h-1-benzopyran-4-one] has been shown to act as a highly selective inhibitor of MEK1 activation and the MAPK cascade (Crews *et al.*, 1992). PD98059 binds to the inactive forms of MEK1 and prevents activation by upstream activators such as c-Raf (Rosen *et al.*, 1994). Concentration for inhibitory activity against MEK1 and MEK2 is around 10 μ M and 50 μ M respectively. Tyrphostin AG490 is a JAK2 protein tyrosine kinase inhibitor that inhibits leptin action with a range of 10 to 100 μ M in different cell types (Potier and Rovira, 1999; Jaleel *et al.*, 2004; Nielsen *et al.*, 2004; Mansour *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Saxena *et al.*, 2007). During the whole maturation period each group of oocytes (0 Lep or 10 Lep) was further treated with 10 or 50 μ M PD98059 (MEK1 inhibitor, Cell signaling Technology, Inc. Beverly, MA, USA) (named as Groups M-0/10, M-0/50, M-10/10 or M-10/50, respectively) and 10 or 100 μ M tyrphostin AG 490 (named as Groups S-0/10, S-0/100, S-10/10 or S-10/100, respectively)

2.4. Confocal microscopy study

After the maturation period, COC were treated for the confocal study. Firstly, cumulus cells were removed in 2 mM hyaluronidase by gentle pipetting. Next, oocytes were treated with 0.5 % w/v pronase to digest the zone pellucidae, were fixed in PBS containing 4 % w/v-buffered neutral paraformaldehyde solution (pH 7.2–7.4) and stored in PBS. Oocytes were washed with permeabilising solution (0.02 % v/v Triton X-100) and treated for 40 minutes with blocking solution (7.5 % w/v bovine serum albumin). They were then incubated 30 minutes at room temperature with 100 μ g/ mL fluorescein isothiocyanate of *lens culinaris* (FITC-LCA) for cortical granule (CG) staining and 15 minutes at 39°C with 10 μ g/ mL propidium iodide (PI) for nuclear staining. After that, oocytes were mounted between a coverslip and a glass slide supported by columns of paraffin and examined under a confocal laser-scanning microscope (Leica, TCS SP5, Wetzlar, Germany). Complete nuclear maturation was measured in terms of metaphase II rate. The rest of nuclear configurations were classified as: oocytes that reinitiated the meiosis process [metaphase I (MI)] or not [germinal vesicle (GV)]. According to a previous work (Arias-Álvarez *et al.*, 2009) CG

distribution was classified as follows (Fig. 2): A) Peripherical: CG were distributed adjacent to the plasma membrane, since they were cytoplasmically matured; B) Cortical: most of the CG were distributed at the cortical area, they were considered as partially matured; C) Homogeneous: CG were distributed throughout the cytoplasm, as they did not show cytoplasmic maturation; D) No homogeneous or abnormal: Anomalous distribution of CG compatible to poor quality or degenerated oocytes.

2.5. Determination of steroids in maturation media

Spent maturation media were collected in spent media after completion of oocyte maturation period and stored at -32°C until analysed. Steroid concentrations were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the principle of competitive binding using a specific kit (Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany) for oestradiol (Estradiol sensitive ELISA) and for progesterone (Progesterone ELISA) quantification. Purified anti-oestradiol and anti-progesterone polyclonal antibodies were used. Intra and inter-assay coefficients of variation were 5.5 % and 6.8 % for E₂, and 5.4 % and 9.9 % for P₄, respectively. The range of the assay was between 0-200 pg/ mL (E₂) and between 0-40 ng/ mL (P₄). Results are expressed as the average E₂ and P₄ concentrations produced by mean of each COC after IVM period. Although otherwise the E₂ concentration was expressed in pg/ mL and P₄ concentration in ng/ mL.

2.6. Statistical analysis

Data were analysed using SPSS program for windows (SPSS 15.0, Inc, Chicago, IL). Chi-square test was carried out to compare the nuclear maturation and cortical granule migration among experimental groups. Means of oestradiol and progesterone concentrations in spent medium per each cumulus-oocyte complex were analysed by ANOVA analysis for independent groups of IVM. All the results are expressed as the mean \pm s.e.m. and the statistical significance was accepted for $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Immunolocalization of ObR

As depicted in Figure 3, positive immunostaining for ObR was found in oocyte, cumulus cells, and granulosa cells of the follicles at all stages of development. Stroma and corpora lutea exhibited immunoreactivity for ObR as well. Theca interna cells showed moderate immunostaining, whereas ObR were not immunolocalized in theca externa cells. Negative control tissue samples showed no positive staining.

3.2. Effect of leptin on nuclear and cytoplasmic oocyte maturation

As shown Fig. 4A, nuclear oocyte *in vitro* maturation was significantly improved when leptin was supplemented in the culture medium at various concentrations (1, 10, 100 ng/ mL) compared to the group without leptin (0 ng/ mL) ($P<0.005$). This beneficial effect is independent of leptin concentration supplied, since 1, 10 and 100 ng/ mL gave similar percentages of MII as the group cultured with FCS. Besides, group with 1 and 10 ng/ mL leptin had the lowest percentages of MI and degenerated chromosome configurations ($P<0.05$) (Table 1). Cytoplasmic maturation rate, in terms of complete CG migration, was significantly enhanced in the group supplemented with FCS compared to the treatments without serum ($P<0.05$) (Fig. 4B). Leptin from 1 to 100 ng/ mL concentrations did not significantly improve peripheral cortical granule migration compared to the treatment without leptin. Significant differences were not found in the percentage of oocytes which presented cortical, homogeneous and non homogeneous CG distribution between groups (Table 1).

3.3. MAPK and STAT3-leptin-associated signal transduction during *in vitro* maturation

Leptin-stimulated nuclear oocyte maturation was significantly impaired when leptin-induced MAPK and STAT3 phosphorylation were suppressed by the specific MAPK and STAT3 inhibitors at all concentrations tested ($P<0.001$) (Fig. 5A; Fig. 6A). According to these results, the percentage of MI and GV in the 10 ng/ mL leptin-groups treated with both inhibitors were

significantly increased ($P < 0.05$) (Table 2; Table 3). The addition of both inhibitors without leptin supplementation did not modified the MII, MI, GV and abnormal nuclear configuration rates (Table 2; Table 3). Regarding cytoplasmic oocyte maturation, addition of MAPK and STAT3 inhibitors did not modify the percentage of oocytes cytoplasmically matured compared to the respective control groups (0 Lep and 10 Lep) (Fig. 5B; Fig 6B). The groups supplemented with leptin and the higher MAPK and STAT3-inhibitor concentrations (50 and 100 μ M, respectively) showed a significantly increase in the number of oocytes with abnormal distribution of cortical granule (CG) migration ($P < 0.05$) (Table 2; Table 3).

3.4. Steroidogenic response of cumulus-oocyte complexes

Mean average oestradiol secretion of each COC was significantly higher in the FCS group compared to those supplemented with 0, 1, 10, 100 ng/ mL leptin ($P < 0.005$). No significant differences were found in P_4 concentrations at the end of the IVM period between groups (Table 4).

When MAPK inhibitors were added to IVM media we observed a significant increase in the E_2 and P_4 secretion by each COC in the M-10/10 and in the P_4 secretion in the M-10/ 50 groups compared to the treatment with 10 ng/ mL leptin alone ($P < 0.05$) (Table 5). In the groups with 0 ng/ mL leptin and MAPK inhibitors average E_2 and P_4 concentrations by mean of each COC after IVM period were similar. When STAT3 inhibitors were included in media no significant differences in E_2 and P_4 secretion by mean of each COC was found (Table 5).

4. Discussion

The results obtained in present work demonstrated that the beneficial influence of leptin on meiotic oocyte maturation is mediated by MAPK and STAT3 pathways. However leptin does not affect cortical granule migration index and steroidogenic response of cumulus-oocyte complexes. Current work evidences, by the first time, the effect of leptin in nuclear and cytoplasmic *in vitro* oocyte maturation, the some underlying intracellular mechanisms and the steroidogenic response using the rabbit oocyte as model. This findings contributes to

enhance the knowledge about the relationship between obesity/lean associated pathologies and leptin concentrations, to continue optimising the IVF techniques.

The presence of leptin and its receptor in the organism are indispensable for the reproductive function (Chehab *et al.*, 1996). The universal distribution of leptin receptors between species and different physiological status is due to the pleiotropic nature of leptin and the highly conserved structure of the ObR (Tartaglia *et al.*, 1995; Bjorjabeck *et al.*, 1997). In this study, long and short isoforms of the ObR were present in the rabbit oocyte, cumulus and granulosa cells of the ovarian follicles at all stages of development, as well as, theca interna, estroma and corpus luteum cells. These findings, corroborate those obtained in the ovaries of several species (human: Karlsson *et al.*, 1997; rat: Zamorano *et al.* 1997; mouse: Matsuoka *et al.* 1999; gilt: Lin *et al.* 2000; Craig *et al.*, 2004; cattle: Thorn *et al.*, 2007), including pseudo pregnant rabbits (Zerani *et al.*, 2004) and contribute to the significant body of evidence about physiological importance of this hormone in the organism, especially at the ovarian level during the preovulatory period (Cioffi *et al.*, 1997; Archanco *et al.*, 2003).

Because of serum and follicular concentrations of leptin are associated to body fat content (Keim *et al.*, 1998) and obese/lean individuals show fertility problems, the implication of leptin on oocyte quality is of keen clinical interest and potentially important for human IVF protocols. In this sense, oocyte maturation is an essential physiological event for species survival. This process implies both nuclear and cytoplasmic changes that includes the peripheral cortical granule migration throughout oocyte cytoskeleton (Edwards 1965; Cran and Esper, 1990). It determines the ability of the oocyte to undergo successful non-polispermic fertilization and embryo development. In some species, leptin seems to promote rearrangement of cytoskeletal elements (Suzuki *et al.*, 2009), which are implicated in the chromosome segregation and in processes of organelle movement (Sun and Schatten, 2006). Current work shows that leptin enhances *in vitro* meiotic oocyte maturation. Also, other *in vitro* studies have reported that leptin resulting in an appropriate spindle

assembly in metaphase (Jin *et al.*, 2008) and it stimulates meiotic oocyte maturation in mouse (Matsuoka *et al.*, 1999), pig (Craig *et al.*, 2004; Kun *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006), and cattle (Paula-Lopes *et al.*, 2007; Van Tol *et al.*, 2008). Ryan *et al.* (2002) showed that leptin only induces meiotic resumption when the oocyte was cultured within its normal follicular environment. Conversely, other authors have reported that leptin had not effect on meiotic resumption and development to MII (mouse: Swain *et al.*, 2004; pig: Suzuki *et al.*, 2009).

Regarding cytoplasmic maturation, first studies (Runner and Gates, 1954) observed that oocytes from ob/ob leptin-deficient mice were able to undergo normal fertilization and embryo development *in vivo*; it lead to postulate that sterility defect due to leptin was not at the level of the oocytes (Swaim *et al.*, 2004). In present work, leptin supplementation did not improve CG migration rate, at the concentrations tested, compared to FCS group which achieved the best results of cytoplasmic maturation similar to those previously reported in rabbit by our group (García-García *et al.*, *in press*). This finding is consistent with the similar proportion of polyspermic oocytes obtained when bovine COC were supplemented with leptin or not (Paula-Lopes *et al.*, 2007). Other studies have suggested that leptin seems to exert its effect only when it is added at very high concentrations (500- 1000 ng/ mL) *in vitro*; inhibiting the reorganization of microfilaments in pig (Suzuki *et al.*, 2009) or improvement cytoplasmic maturation in cattle (Van Tol *et al.*, 2008). In turn, these results are not in agreement with the findings obtained by other works, in which much lower leptin concentrations (1- 100 ng/ mL) resulted in an increase of developmental competence related to an improvement of oocyte cytoplasmic maturation (bovine: Boelhauve *et al.*, 2005; pig: Craig *et al.*, 2004; Kun *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008). Controversial IVM results reported probably are dependent of the culture medium or specie used. The experiments described in present work, and in Van Tol *et al.* (2008) ones, were performed in the absence of any growth factor or hormone other than leptin. However, authors usually added to culture medium gonadotropins, growth factors or follicular fluid that could be enhanced the sensitivity of COC for leptin showing different leptin- responses at lower concentrations. However, as it is shown in this study, at

those concentrations leptin did not affect cytoplasmic maturation by itself. Therefore, the implication of this hormone on oocyte quality may be mediated by other factors present in such media. Possible interactions between them and the effects on oocyte maturation remain without clarify. Thus, it is evident that the model system and culture conditions utilized are important factors in understanding leptin's influence on COC maturation. Therefore further standardized studies should be required, since leptin does may be affecting oocyte quality mediating the action of other drugs used in the stimulation protocols of the fertility treatments.

The developmental potential of oocytes is also influenced by the synthesis and release of cumulus- and oocyte- derived factors as steroids. Measurements of steroids at the end of maturation period are commonly used to assess the steroidogenic capacity of COC (Lorenzo *et al.*, 1997; Mingoti *et al.*, 2002; Shirazi and Moalemian, 2007). Present work shows that leptin in a free culture media did not exert a short- effect on the final oestradiol and progesterone secretion of COC in a dose dependent manner. Therefore, under our experimental conditions, leptin-stimulation of meiotic maturation is not mediated by an increase of steroid secretion by COC *in vitro*. Contradictory results exist about stimulatory or inhibitory leptin's effects on steroidogenesis (Zachow *et al.*, 1997; Duggal *et al.*, 2002; Tsai *et al.*, 2002; Catalano *et al.*, 2003; Ruiz-Cortes *et al.* 2003; Swain *et al.*, 2004; Muñoz-Gutierrez *et al.*, 2005). Besides, most of these studies were performed in single- cell suspensions of granulose cells. Steroidogenic activity of COC differs largely from mural granulose cells, due to their direct proximity to the oocyte and interaction with oocyte-derived paracrine factors. Therefore, caution must be taken when comparing these works. In current study, gonadotropins or growth factors present in the FCS, probably were responsible for the significantly increase in the final oestradiol concentrations found in the spent media of FCS group, in agreement with previous reports (Vanderhyden and Tonary, 1995). As other authors have reported, oestradiol secreted by cumulus cells could induce a rapid increase in free intracellular calcium concentration, this mechanism improves cytoplasmic maturation (bovine: Younis *et al.*, 1989, human: Tesarik and Mendoza, 1997). Also, in bovine oocytes,

oestradiol probably participates in the formation of the polyspermic block via cortical granules (Karlach, 1987). These findings are consistent with the results obtained about CG migration rate in this study. Similar amounts of progesterone secreted by COC of all experimental groups is according to previous reports showing that progesterone does not seem to play a physiological role in oocyte meiotic maturation (Dode and Graves, 2002; Lucidi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006). Other authors have suggested that this is the physiological stimulus for resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes and other mammals (Maller and Krebs, 1980; Leroy *et al.*, 2008) and it seems to be involved in promoting the formation of MPF (Bhattacharyas *et al.*, 2007). In this sense, percentage of oocytes that not resumed meiosis (GV) in this study was similar in all groups as well.

Leptin could acts as modulator of oocyte quality through the activation of specific transcription factors. Of the known ObR isoforms, only the full length one contains the intracellular domains necessary to mediate Jak /STAT3 and MAPK signal-transduction pathways. Current work provides the first evidence that leptin activates both MAPK and STAT3 pathways to improve meiotic maturation of rabbit oocytes *in vitro* in agreement with previous results (Matsuoka *et al.*, 1999; Craig *et al.*, 2004). The phosphorylation of STAT3 by leptin receptor-bound Jak kinases results in changes in the survival and differentiation of the cells (Fedorcsak and Storeng, 2003). Although STAT3 null mice are embryonic lethal (Takeda *et al.*, 1997), its role in the ovary has not yet been elucidated. The function of leptin during nuclear oocyte maturation by activating the STAT3 signal transduction pathway was first suggested by Matsuoka *et al.* (1999). In heifers, cumulus cells seems to be more responsible to leptin than the oocyte itself, mediating the leptin- STAT3 signals to improve oocyte meiotic maturation by the ObR- long isoform (Paula-Lopes *et al.*, 2007). Although it is shown that the expression of ObR_b is very low during oocyte maturation (pig: Craig *et al.*, 2004, bovine: Van Tol *et al.*, 2008) this study shows that leptin action on rabbit meiotic oocyte maturation seems to be mediated at least by the long isoform of the ObR. The short isoforms only capable of MAPK signal transduction (Bjorjabeck *et al.*, 1997) could be also mediating the leptin action on oocyte maturation, but this hypothesis remains to be fully

established in rabbit oocyte model. In contrast with that reported by Matsuoka *et al.* (1999) and Paula-Lopes *et al.* (2007), others authors (Van Tol *et al.*, 2008) showed that leptin did not increase phosphorylated STAT3 but more phosphorylated MEK1- and MEK2- MAPK proteins were predominant in COC during IVM and an increase of the speed of nuclear maturation occurs (Van Tol *et al.*, 2008). In this sense, Craig *et al.* (2004) also showed that leptin activates MAPK pathway in the oocyte. MAPK promote the Maturation Promoting Factor (MPF) activity and are involved in the post-meiotic resumption events, such as spindle formation, MI to MII transition and MII arrest in several species including rabbits (Yu *et al.*, 2002), as it is suggested in current work.

As we expected, this study also showed the non-suppression of leptin-induced oocyte CG migration by STAT- and MAPK- inhibitors. However, with leptin, the highest STAT3- and MAPK inhibitor- concentration induced an increase in the percentage of abnormal distribution of CG, suggesting a possible cytotoxic effect of them. These results suggest that oocyte may be a cell more sensitive to higher concentrations of both inhibitors widely used in other cell- type studies (Jaleel *et al.*, 2004; Mansour *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Saxena *et al.*, 2007). In agreement with our results, it has been reported that leptin signaling through the STAT3 pathway is not required for reproduction since mice with disrupted ObR_b- STAT3 signaling are obese yet fertile (Bates *et al.*, 2003) at least to oocyte stage (Takeda *et al.*, 1997). However, MAPK proteins seem to be necessary for pronuclear formation in partenogenetically activated oocytes (Posada and Cooper, 1992; Liu *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2004), microfilaments formation and therefore, for organelles distribution and polarity establishment in the oocyte (Verlhac *et al.*, 2000; Sun and Schatten, 2006). This discrepancy points to a possible species-specific mode of action of the leptin system on oocyte maturation or, that MAPK implicated in some aspects of cytoplasmic maturation were other than those inhibited in this study (MEK1-2). Thus, the direct influence of leptin in the oocyte and the underlying mechanisms that control maturation process need further studies.

Without leptin supplementation, there is not a significant activation of MAPK and STAT proteins by COC and COC-steroid secretion. Consequently, meiotic maturation rate and concentrations of steroids were not modified when the inhibitors were added. However, leptin supplementation induced an activation of MAPK and STAT3 pathways in COC that increase oocyte meiotic maturation; but similar values of these steroids were obtained when both inhibitors were included in the media with leptin, compared to the group with only leptin. This allows us to hypothesize that, in our experimental conditions, stimulation of meiotic maturation by leptin was not mediated by an increase of steroid secretion-induced by activation of MAPK or STAT3 proteins. The highest secretion of steroids only found in some groups with leptin and MAPK inhibitors was unclear. Probably a compensatory mechanism, as a consequence of inhibition of leptin-induced MAPK pathway, could be increasing secretion. However, why this occurs and the potential cross talk between MAPK and STAT3 pathways and steroid secretion in COC units need further research.

In conclusion, current work provides the first evidence that leptin itself enhances meiotic oocyte maturation throughout activation of both STAT3 and MAPK pathways in the rabbit oocyte model. This beneficial effect is not mediated by an increase of oestradiol and progesterone secretion by cumulus-oocyte complexes and it is not observed for cytoplasmic maturation, in terms of cortical granule migration. Consequently, leptin is not the key factor that alters significantly oocyte quality associated to different concentrations *in vitro* and possibly to body fat content. Therefore, the understanding of detailed mechanisms by which leptin and other factors related to body fat stores affect the fertility potential of oocytes is needed to improve the success of assisted reproductive technologies in human and animals.

Acknowledgements

This work was supported by MEC projects AGL07-60168, AGL08-022283 and UCM-CM research program (920249-2008). MAA has been granted a scholarship by CM and FSE, and RMGG was supported by the “Juan de la Cierva” MEC Program. The authors wish to thank Dr. J. Contreras and Dr. L. Revuelta for their support in the experimental part of this work.

Figure 1. Schematic representation of the experimental design.

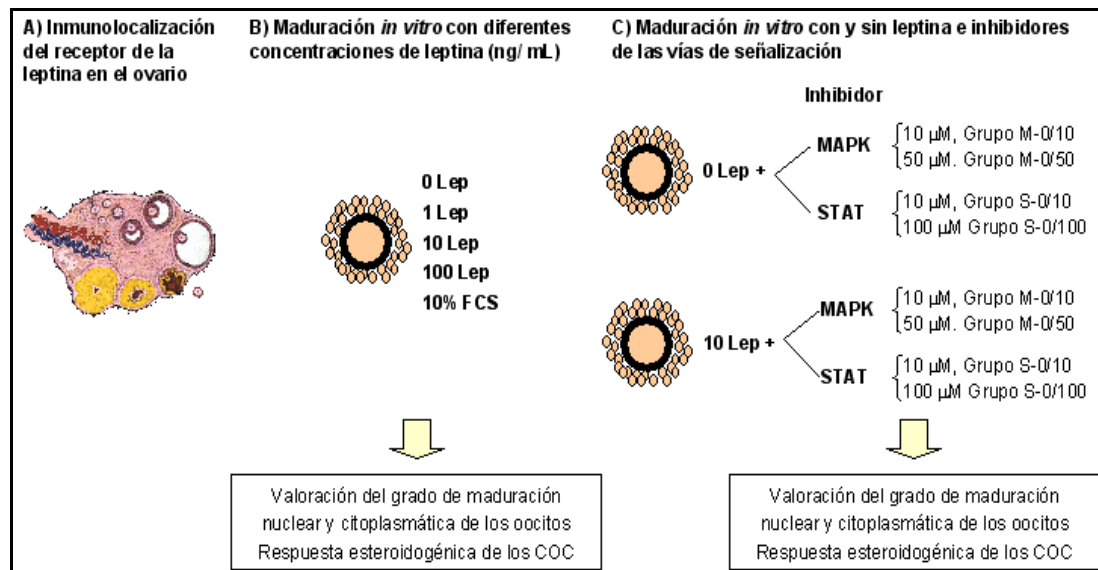


Figure 2. Nuclear and cytoplasmic oocyte maturation related to cortical granule (CG) migration: A) Peripheral CG distribution and metaphase II; B) homogeneous distribution. Oocyte diameter is around 80 μ m.

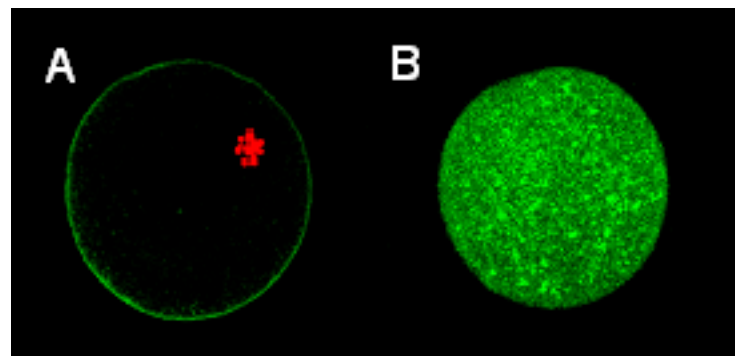


Figure 3. Immunolocalization of leptin receptor in ovarian sections of rabbit does. A) Negative control, B) positive staining of ObR in oocytes and granulose cells of primordial, primary and secondary follicles, C) Antral follicle with staining of ObR in granulose cells, D) Detailed of immunodetection of ObR in granulose cells. Teca cells show negative immunostaining. O: oocyte; G: granulose cells; T: teca cells.

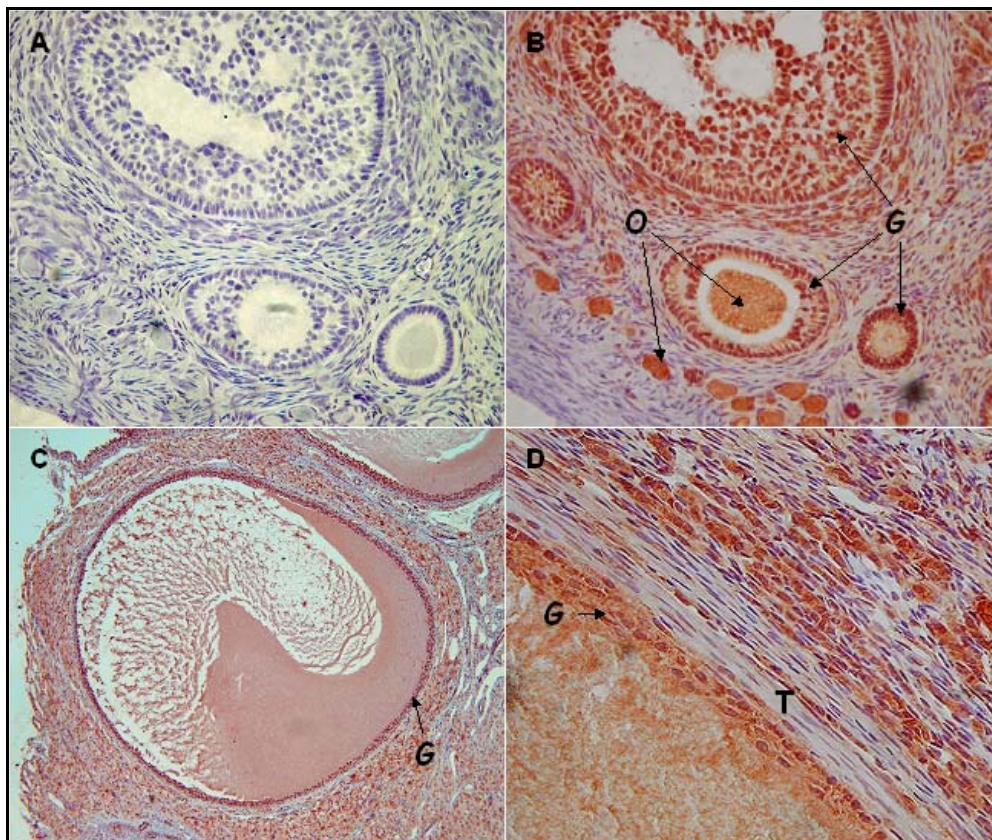


Figure 4. A) Metaphase II rate and B) peripheral cortical granule migration index in rabbit cumulus oocyte- complexes at 16 hours maturation time period following use of different concentrations of leptin.

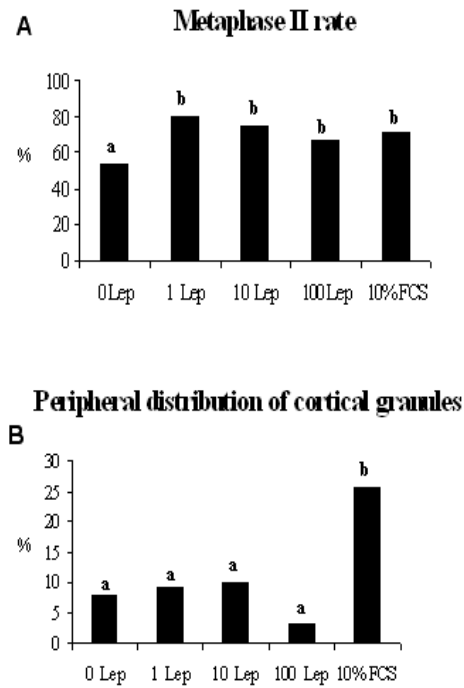


Figure 5. A) Metaphase II rate and B) peripheral cortical granule migration index in rabbit cumulus oocyte- complexes in vitro

Figure 6. A) Metaphase II rate and B) peripheral cortical granule migration index in rabbit cumulus oocyte- complexes in vitro matured with STAT3 inhibitors at different concentrations with 0 or 10 ng/ mL leptin.

matured with MAPK inhibitors at different concentrations with 0 or 10 ng/ mL leptin.

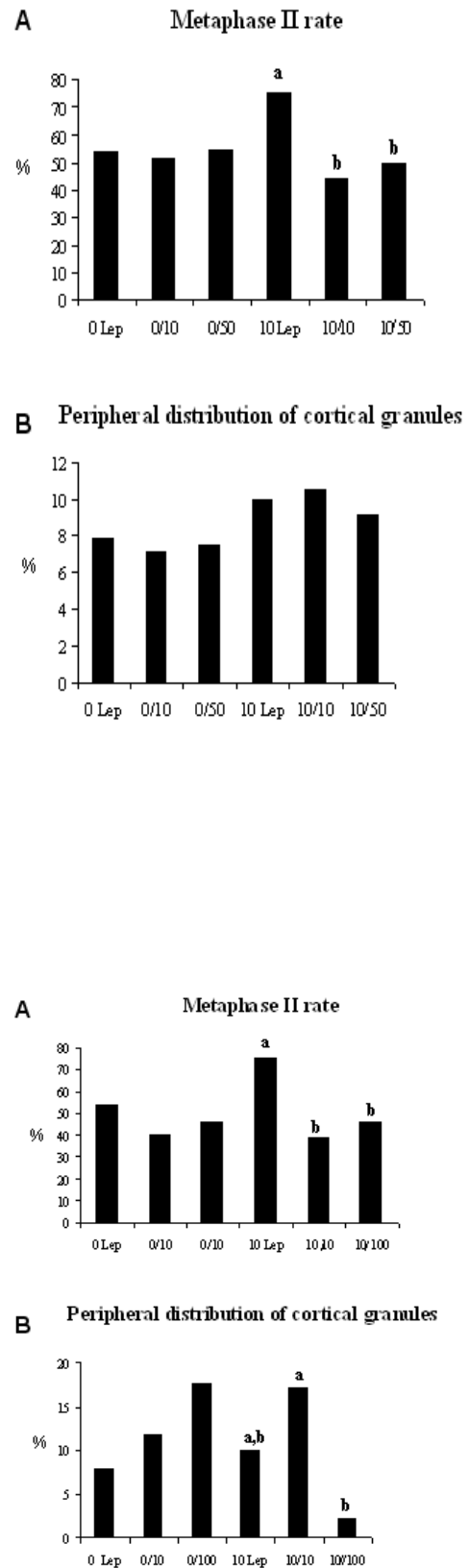


Table 1. *Meiotic and cytoplasmic configurations rates observed in rabbit oocytes at 16 hours maturation time period following use of different concentrations of leptin.*

	0 Lep	1 Lep	10 Lep	100 Lep	10% FCS
Metaphase II rate	54,05a	79,35b	75,19b	66,38b	71,62b
Metaphase I rate	19,8c	5,4d	7,8d	11,2c,d	17,6c
Germinal vesicle rate	17,1	15,2	14	25	18,9
Abnormal chromosome configuration	9d	0c	3,1c,d	7,8d	9,5d
Peripheral distribution	7,9c	9,3c	10c	2,9c	25,7d
Cortical distribution	6,3c,d	23,3c	8,3c,d	20c,d	2,9d
Homogeneous distribution	82,5	60,5	81,7	77,1	68,6
Abnormal distribution	3,2	7	0	0	2,9

Values are mean \pm SEM. Means in rows with different letters differ: ^{a, b} ($P < 0.005$) ^{c, d} ($P < 0.05$).

Table 2. *Meiotic and cytoplasmic configurations rates observed in rabbit oocytes in vitro matured with MAPK inhibitors at different concentrations and with 0 or 10 ng/ mL leptin.*

	0 Lep	0 / 10	0/50	10 Lep	10/10	10/50
Metaphase II rate	54,1	51,4	54,4	75,2a	44,1b	49,3b
Metaphase I rate	19,8	20,3	14,7	7,8a	22,6b	26,8b
Germinal vesicle rate	17,1	23	29,4	14c	29d	22,5c,d
Abnormal chromosome configuration	9	5,4	1,5	3,2	4,3	1,4
Peripheral distribution	7,9	7,1	7,5	10	10,5	9,1
Cortical distribution	6,3	12,5	2,5	8,3	13,2	11,4
Homogeneous distribution	82,5	69,6	87,5	81,7	76,3	68,2
Abnormal distribution	3,2	10,7	2,5	0a	0a	11,4b

Values are mean \pm SEM. Means in rows with different letters differ: ^{a, b} ($P < 0.005$) ^{c, d} ($P < 0.05$).

Table 3. *Meiotic and cytoplasmic configurations rates observed in rabbit oocytes in vitro matured with STAT3 inhibitors at different concentrations and with 0 or 10 ng/ mL leptin.*

	0 Lep	0/10	0/100	10 Lep	10/10	10/100
Metaphase II rate	54,1	40	45,5	75,2a	38,7b	45,9b
Metaphase I rate	19,8	24	30,3	7,8a	25,3b	17,6a,b
Germinal vesicle rate	17,1	24	18,2	14a	33,3b	27b
Abnormal chromosome configuration	9	12	6,1	3,1	2,7	8,1
Peripheral distribution	7,9	11,8	17,6	10c,d	17,1c	2,2d
Cortical distribution	6,3	23,5	14,7	8,3	17,1	17,8
Homogeneous distribution	82,5	64,7	67,6	81,7c	58,5d	64,4c,d
Abnormal distribution	3,2	0	0	0c	7,3c,d	15,6d

Values are mean \pm SEM. Means in rows with different letters differ: ^{a, b} ($P < 0.005$) ^{c, d} ($P < 0.05$).

Table 4. Steroid production in rabbit cumulus oocyte- complexes at 16 hours maturation time period following use of different concentrations of leptin.

	0 Lep	1 Lep	10 Lep	100 Lep	10% FCS
E ₂ secretion/ COC	0.28 ± 0.14 ^a	0.22 ± 0.02 ^a	0.32 ± 0.14 ^a	0.34 ± 0.11 ^a	4.13 ± 0.77 ^b
P ₄ secretion/COC	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.004	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.003

Values are mean ± SEM. Means in rows with different letters differ: ^{a, b} ($P < 0.005$) ^{c, d} ($P < 0.05$).

Table 5. Steroid production in rabbit cumulus oocyte- complexes at 16 hours maturation time period following use of different concentrations of MAPK and STAT leptin –pathway inhibitors.

	0 Lep	0 / 10	0 / 50	10 Lep	10 / 10	10 / 50
E ₂ secretion/ COC	0.05 ± 0.01c	0.10 ± 0.02d	0.11 ± 0.01d	0.04 ± 0.01c	0.13 ± 0.02d	0.07 ± 0.01c
P ₄ secretion/COC	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.01 ± 0.00c	0.04 ± 0.00d	0.05 ± 0.01d
	0 Lep	0 / 10	0 / 100	10 Lep	10 / 10	10 / 100
E ₂ secretion/ COC	0.18 ± 0.04	0.23 ± 0.11	0.10 ± 0.05	0.39 ± 0.17	0.44 ± 0.24	0.14 ± 0.05
P ₄ secretion/COC	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.06 ± 0.03	0.02 ± 0.00

Values are mean ± SEM. Means in rows with different letters differ: ^{a, b} ($P < 0.005$) ^{c, d} ($P < 0.05$).

6. DISCUSIÓN GENERAL

La tasa de fertilidad de las conejas en condiciones fisiológicas óptimas, es decir, cuando no son lactantes y presentan una condición corporal adecuada, puede alcanzar valores en torno al 90% (Castellini *et al.*, 2006). Sin embargo, las conejas primíparas presentan marcadas caídas de la fertilidad cuando se inseminan en periodos cercanos al primer parto, que reducen considerablemente los beneficios económicos de las explotaciones (Cervera *et al.*, 1993; Xiccato *et al.*, 2005; Feugier y Fortun-Lamothe, 2006; Cardinali *et al.*, 2008; Rebollar *et al.*, 2009). En otras especies, también sometidas a una producción intensiva como, por ejemplo, las vacas lecheras, existe una evidencia de que la calidad del oocito y del embrión son algunos de los factores determinantes de la reducción del éxito reproductivo durante el post-parto (Leroy *et al.*, 2008). Por lo tanto, es posible que los cambios metabólicos y hormonales acontecidos durante ese periodo que afectan al proceso de foliculogénesis y a la competencia del oocito ligada a la calidad folicular, sean los responsables de la fertilidad reducida en las conejas primíparas. En base a esta premisa, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral ha sido profundizar en el conocimiento de algunos mecanismos que intervienen en la fisiología reproductiva de la coneja ligados al balance energético negativo y a la lactación y que pueden afectar a la calidad de los folículos y a la competencia de los oocitos; todo ello, asociado a la realización de diferentes manejos reproductivos y nutricionales en conejas primíparas. Además, se evaluó con mayor detalle el efecto directo sobre la maduración *in vitro* de los oocitos, de uno de los principales marcadores endocrinos del déficit energético: la leptina.

Dentro de las **estrategias reproductivas** estudiadas en el primer capítulo de la presente Memoria, el objetivo del **Experimento 1a** fue el estudio de la población folicular y de la competencia del oocito después de la aplicación de dos tratamientos de sincronización de estro en conejas primíparas lactantes el día de su IA (día 11 post-parto). Se comparó el efecto de un método hormonal con eCG y de un tratamiento no hormonal, que trata de reducir la influencia negativa de la lactación mediante una separación puntual de la madre y los gazapos durante 24 horas. En este sentido, varios autores han comprobado que el destete transitorio durante 48 horas reduce las concentraciones de prolactina séricas y mejora la secreción de FSH y LH de forma natural, lo que estimularía el desarrollo folicular y la esteroidogénesis (Ubilla *et al.*, 2000a; 2000b). Mediante nuestro estudio, se evidenció que con la separación transitoria de la camada, solamente durante 24 horas, los niveles séricos de estradiol y el número de folículos antrales desarrollados mostraron valores similares a los obtenidos con el tratamiento con eCG. Además, en ambos tratamientos de sincronización se observaron tasas similares de atresia folicular avanzada que afectaban principalmente a las células de la granulosa, y que explicarían en parte los niveles equivalentes de estradiol alcanzados en el momento de la IA, de acuerdo con lo descrito por otros autores (McNatty *et al.*, 1984). Sin embargo, en los ovarios de los animales tratados con eCG se observó un mayor número de folículos con un grado medio de atresia. Esto sugiere que las

gonadotropinas sintéticas podrían hacer que las células de la granulosa fueran especialmente susceptibles al proceso de apoptosis (Kim *et al.*, 1998; Salvetti *et al.*, 2007), induciendo la formación de folículos atrésicos tempranos (Hughes and Gorospe, 1991; Sirard *et al.*, 1999) sin que generen una disminución significativa en la secreción de estradiol (Jolly *et al.*, 1997), si bien la calidad de los oocitos puede verse afectada (Jewgenow *et al.*, 1991). Los resultados obtenidos en este estudio pusieron de manifiesto que, tanto la maduración nuclear como la capacidad esteroidogénica de los COC en los dos grupos experimentales fueron similares, estableciéndose una posible relación entre ambos parámetros, tal y como se ha sugerido en estudios previos (Andersen *et al.*, 1993; Lorenzo *et al.*, 1997). Sin embargo, en los oocitos procedentes de conejas bioestimuladas se obtuvieron mejores tasas de maduración citoplasmática *in vitro* que en los obtenidos de conejas tratadas con eCG, por lo tanto, los primeros tendrían mayores probabilidades de ser fecundados con éxito. Trabajos realizados en otras especies también apuntan que la sincronización hormonal disminuye la competencia de los oocitos e induce anomalías morfológicas en los mismos (vaca: Assey *et al.*, 1994; Greve *et al.*, 1995; oveja: O'Callaghan *et al.*, 2000).

En base a estos resultados, creemos que la sincronización transitoria de la camada podría ser un método de sincronización no hormonal alternativo a los tratamientos convencionales con eCG en conejas primíparas sometidas a un ritmo semi-intensivo de producción, ya que mejora el estatus ovárico, en lo que se refiere a la calidad folicular y del oocito, lo que resulta fundamental para una vida productiva mas longeva de las conejas.

Además del efecto negativo de la lactación, el déficit energético y el estrés metabólico asociados a la inseminación en un periodo cercano al primer parto, son los principales factores condicionantes que determinarían la reducción tan marcada de la fertilidad de las conejas de alta producción (Fortun-Lamothe y Prunier, 1999; Castellini *et al.*, 2003; Xiccato *et al.*, 2005; Feugier y Fortun-Lamothe, 2006). Luego, es necesario aplicar ritmos reproductivos que se adapten a la fisiología de las hembras, en particular en aquellas que se encuentran en su primera lactación. No obstante, existen escasos trabajos que proporcionen una base fisiológica que sustenté uno u otro manejo. Teniendo en cuenta estas premisas, se diseñó el **Experimento 1b**, en el cuál se estudió el efecto del manejo reproductivo, basado en la influencia del momento del post-parto en que se realiza la IA (día 11- Grupo semi-intensivo- o, día 32 –Grupo extensivo-), sobre el estatus endocrino, metabólico y ovárico en conejas primíparas. Los resultados mostraron cómo el estrés metabólico que sucede en el día 11 post-parto y el déficit en la composición corporal asociado impactan sobre la fisiología ovárica, en particular, sobre el grado de atresia folicular y sobre la competencia de los oocitos, dando lugar a índices reproductivos considerablemente inferiores que en las hembras inseminadas el día 32 post-parto.

Las conejas de ambos grupos experimentales mostraron niveles séricos de estradiol, progesterona y prolactina similares en el momento de la IA. Esto puede ser debido a que, las hembras inseminadas el día 11 post-parto fueron sincronizadas mediante destete transitorio durante 24 horas, en base a los resultados obtenidos en el Experimento 1a. Como ya se ha mencionado, este método, reduciría los niveles de prolactina estimulando el desarrollo folicular y la síntesis de estradiol en el grupo semi-intensivo de forma similar al grupo extensivo antes de la IA (Ubilla *et al.*, 2000a; 2000b; Rebollar *et al.*, 2008). La intensidad y distribución del receptor de la prolactina en el ovario también fue similar, corroborando los resultados obtenidos anteriormente por el grupo (García-García *et al.*, 2007) y, también el hecho, de que esta hormona puede afectar directamente a la actividad ovárica en la coneja, en particular, al desarrollo folicular (Ben-Jonathan *et al.*, 1996) y a la maduración del oocito *in vitro* (Yoshimura *et al.*, 1989).

Por otro lado, a lo largo del periodo post-parto las reservas proteicas, grasas y energéticas corporales de las madres mejoraron significativamente, de acuerdo con estudios previos (Xiccato *et al.*, 2005). En concordancia, las concentraciones de NEFA disminuyeron respecto al día del parto, reflejando una reducción en la movilización de los depósitos grasos, de acuerdo con estudios previos realizados en esta especie (Fortun, 1994). Por el contrario, los niveles séricos de proteínas totales y leptina fueron aumentando desde el día del parto hasta el día 32 post-parto. Según estos resultados, postulamos que en el día 11 post-parto las conejas aún no han recuperado suficientemente las reservas corporales, principalmente proteicas y grasas, utilizadas en la primera gestación para el desarrollo uterino (Fortun-Lamothe, 2006) y el crecimiento exponencial de los fetos (Young, 1979); a lo que se suman las necesidades para sostener su propio crecimiento. Todo ello se refleja en las alteraciones observadas en la composición corporal y en los parámetros metabólicos a día 11 post-parto. Consecuentemente, los ovarios de estos animales presentaron un número más elevado de folículos atrésicos y una reducción marcada en la tasa de maduración nuclear y citoplasmática de los oocitos, comparados con los ovarios de las conejas inseminadas después del destete.

El aumento significativo de los niveles de leptina sérica entre el día 11 y el día 32 post-parto, nos hace pensar que esta hormona podría ser uno de los factores endocrinos involucrados en el proceso de apoptosis folicular y, por lo tanto, en la competencia de los oocitos, de acuerdo con los hallazgos demostrados *in vitro* en otras especies (rata: Almog *et al.*, 2001; ratona: Hamm *et al.*, 2004). El incremento en las proteínas séricas totales que también se observó en nuestro trabajo podría ser otro de los factores que influirían en el aumento de la calidad de los oocitos a lo largo del post-parto (Hong y Lee, 2007). Sin embargo, los niveles de NEFA, similares en ambos días de la IA, induce a pensar que éstos podrían no ser los

factores principales involucrados en la calidad de los folículos y los oocitos, al contrario de lo descrito en otras especies como en la vaca (Leroy *et al.*, 2008), donde se ha establecido la relación entre los niveles de NEFA, el índice de apoptosis folicular (Vanholder *et al.*, 2005) y la competencia del oocito *in vitro* (Leroy *et al.*, 2005). Los resultados obtenidos parecen sustentar el hecho de que en la coneja se requieren más estudios que expliquen estas posibles diferencias.

Por otro lado, en concordancia con los resultados metabólicos, endocrinos y ováricos mostrados en este estudio, se observó que, la fertilidad y la prolificidad se redujeron considerablemente en el grupo de conejas inseminadas a 11 día post-parto, de igual manera a lo señalado previamente en esta especie en otros estudios productivos (Fortun-Lamothe y Prunier, 1999). En líneas generales, estos hallazgos coinciden con los obtenidos en otras especies de alta producción, como en ganado vacuno de leche, donde claramente se observa que las condiciones relacionadas con la lactación temprana afectan a la condición corporal; todo ello se refleja en fluctuaciones endocrinas y metabólicas y en la calidad de los oocitos, especialmente durante la primera lactación (Domínguez, 1995; Snijders *et al.*, 2000; Walters *et al.*, 2002).

Por lo tanto, los resultados mostrados en el Experimento 1b, proporcionarían el fundamento fisiológico que establece que la IA después del destete podría ser una alternativa real de manejo reproductivo, al menos, en las conejas primíparas.

Otras vías de acción para intentar optimizar la función reproductora de las conejas primíparas lactantes están orientadas al establecimiento de **estrategias nutricionales** que mejoren su capacidad de ingestión durante el periodo post-parto temprano, cuando las madres son alimentadas con un pienso con mayor contenido energético. Por ello se plantearon los dos experimentos de que consta el capítulo 2 de esta Memoria, que estudiaron los efectos de una estrategia nutricional basada en la utilización de piensos fibrosos con una cantidad elevada de lignina durante la recría. La composición corporal, el estatus metabólico y los cambios que acontecen en la calidad folicular, la maduración de los oocitos y la supervivencia embrionaria durante el desarrollo preimplantacional fueron analizados; y todo ello tanto a corto como a medio plazo, en conejas nulíparas y primíparas respectivamente, en el momento de la inseminación.

Los resultados del **Experimento 2a**, mostraron que las conejas nulíparas podían aumentar su capacidad de ingestión durante la recría mientras se les suministraba un pienso fibroso con alto contenido en lignina (Grupo HL). Esto es debido a que la digestibilidad de este tipo de dietas es menor, lo que aumenta la velocidad de tránsito intestinal que induce a un mayor consumo de pienso, como otros autores han constatado previamente (Nizza *et al.*,

1997; Xiccato *et al.*, 1999; Nicodemus *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2002). Basándonos en el peso de los animales, la primera IA tuvo lugar a las 16 semanas de edad, cuando alcanzaron el 80% de su peso adulto, que es el apropiado para realizar la IA en la coneja según Rommers *et al.* (2002; 2004). Aunque los pesos en el momento de la IA fueron similares, el análisis de la composición corporal reveló que las conejas que estaban alimentándose con el pienso HL presentaban una reducción significativa del contenido graso y energético corporal, así como, unos niveles séricos de leptina menores que el grupo alimentado con una cantidad estándar de lignina (Grupo SL). A su vez, las concentraciones de leptina obtenidas en ambos grupos experimentales fueron superiores a las descritas previamente por nuestro grupo en hembras prepúberes (Nicodemus *et al.*, 2007), lo que podría reflejar que las reservas corporales a las 16 semanas fueron suficientes para dar lugar a los valores de fertilidad obtenidos que se encontraban dentro de los normales para conejas nulíparas (Nizza *et al.*, 1997; Xiccato *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2002; Castellini *et al.*, 2006). Sin embargo, los niveles de leptina no sólo están relacionados con la cantidad de grasa corporal (Keim *et al.*, 1998), sino también con la capacidad de ingestión y la función reproductiva (Zhang *et al.*, 1994; Delavaud *et al.*, 2002; Brecchia *et al.*, 2006). Así, la presencia de concentraciones bajas de leptina estimularía la ingesta de alimento (Foster y Nagani, 1999; Rommers *et al.*, 2004). Este fenómeno se confirmó en las conejas alimentadas con la dieta HL en este estudio, ya que, aunque su consumo de pienso fue mayor, presentaron una tasa de fertilidad menor que las alimentadas con un pienso con menos lignina.

En este mismo sentido, estudios realizados en otras especies muestran como las dietas fibrosas antes del momento de la IA pueden mejorar los perfiles endocrinos de los folículos preovulatorios, la capacidad de maduración del oocito y el desarrollo embrionario posterior (vaca: McEvoy *et al.*, 1997; cerda: Ferguson *et al.*, 2006; 2007). En nuestro estudio, con ambas dietas fibrosas, no se apreciaron modificaciones significativas en ninguno de los parámetros ováricos medidos, ni en la tasa de embriones viables recuperados, ni en la prolificidad. Sin embargo, las conejas alimentadas con el pienso HL mostraron un número ligeramente menor de oocitos que maduraron correctamente a nivel citoplasmático. Teniendo en cuenta que la calidad del oocito es el principal factor que afecta a la tasa de desarrollo embrionario posterior (Lonergan *et al.*, 2006) estos resultados explicarían, en parte que, aunque se recogieron un número similar de embriones morfológicamente viables a los 3,5 días de la IA, cuando éstos fueron cultivados *in vitro*, su capacidad de desarrollo o supervivencia fue inferior en aquéllos procedentes de las conejas alimentadas con el pienso HL.

Por lo tanto, el Experimento 2a muestra que la dieta con alto contenido en lignina genera un aumento en el consumo de pienso de las conejas nulíparas. No obstante, da lugar a una

disminución de las reservas energéticas y de los niveles de leptina, lo que en el momento de su primera IA no afecta significativamente a los parámetros ováricos medidos pero sí a la supervivencia de los embriones, estimada por su capacidad de desarrollo *in vitro*, y a la fertilidad; aunque ésta última está dentro de rangos normales y de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores (Nizza *et al.*, 1997; Castellini *et al.*, 1998; Xiccato *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2002; Castellini *et al.*, 2006).

En base a estos resultados, para valorar si el efecto de este tipo de dietas sobre el estatus ovárico se producía a más largo plazo y, si la disminución en la fertilidad de las conejas alimentadas con el pienso HL podría verse compensada con un aumento de la ingestión durante su primera lactación y, por lo tanto, con una mejora de la fertilidad en la segunda IA se realizó el **Experimento 2b**. De este modo, se analizó el efecto del mismo pienso de recría sobre la fisiología ovárica y embrionaria en conejas primíparas inseminadas el día 11 post-parto. Además, debido a que en las granjas cunícolas la IA de estos animales no se contempla sin un método de sincronización de estro asociado, en este estudio, y para reproducir al máximo las condiciones productivas utilizadas en las explotaciones, se realizó en ambos grupos experimentales una separación transitoria de la camada de 24 horas, como método de sincronización, en base a los resultados obtenidos en el Experimento 1a. Probablemente, debido a esto, el día de la segunda IA se observaron niveles séricos de estradiol y de progesterona, poblaciones de folículos antrales y tasas de ovulación similares para las dos dietas, que pueden ser atribuidos al efecto estimulante que ejerce este método de sincronización sobre el desarrollo folicular final, descrito en el Experimento 1a.

Por otro lado, se observó que las conejas alimentadas con el pienso HL durante la recría no mostraron un aumento de su capacidad de ingestión para compensar su balance energético negativo ni el déficit de composición corporal durante la lactación temprana al contrario de lo sugerido previamente por otros autores (Nizza *et al.*, 1997; Xiccato *et al.*, 1999; Pascual *et al.*, 2002). De forma similar a los resultados obtenidos en el Experimento 1b, los pesos de las conejas, los parámetros metabólicos y la composición corporal evolucionaron favorablemente desde el parto hasta el momento de la IA. Sin embargo, ningún tratamiento nutricional aplicado en la recría mejoró dichos parámetros en la lactación temprana, ni tampoco la fertilidad al segundo parto. De hecho, los resultados reproductivos no se optimizaron respecto a los obtenidos en trabajos anteriores realizados por nuestro grupo utilizando un ritmo reproductivo similar (Rebollar *et al.*, 2006a; 2006b; 2009). Estos resultados, además concuerdan con trabajos previos que muestran que las reservas corporales y el éxito reproductivo en animales de alta producción están íntimamente relacionados (Fortun-Lamothe, 2006; Lucy, 2007).

Los efectos de la nutrición a largo plazo se han evidenciado en otras especies (cerda: Cia *et al.*, 1998; vaca: Mantovani *et al.*, 1993). En nuestro estudio, las conejas alimentadas con el pienso HL durante la recría, mostraron en el día 11 post-parto un índice mayor de atresia folicular, una reducción del número de oocitos que completan su maduración nuclear, un mayor porcentaje de oocitos con alteraciones en los patrones de migración de gránulos corticales (considerados degenerados o de baja calidad) y por lo tanto, una disminución en el número de embriones viables y un incremento en la tasa de embriones degenerados a la recogida. Sin embargo, cuando los embriones considerados como viables en cuanto a su morfología, se cultivaron en un medio similar para valorar su capacidad de supervivencia *in vitro*, no mostraron diferencias significativas en su desarrollo en ambos grupos experimentales. Teniendo en cuenta que el tiempo medio que tardaría un folículo primario en alcanzar el tamaño preovulatorio sería de 97 días en la coneja (Mariana *et al.*, 1989), esto implicaría que estados nutricionales determinados y mantenidos durante un periodo prolongado de tiempo, como en nuestro caso, en la recría, podrían alterar el ambiente bioquímico y endocrino y, por lo tanto, el desarrollo folicular y la oogénesis. Lo cual, y de acuerdo con nuestros resultados, influiría finalmente a medio-largo plazo sobre diferentes fenómenos reproductivos importantes como son: la calidad folicular y de los oocitos preovulatorios y, en consecuencia, de los cuerpos lúteos formados, del ambiente oviductal producido y de la capacidad de desarrollo del embrión preimplantacional en periodos posteriores (Britt, 1992; Boland *et al.*, 2001; Mc Evoy *et al.*, 2001). Estos efectos a medio plazo podrían estar mediados por las posibles variaciones en otros factores endocrinos y metabólicos a consecuencia de los tratamientos nutricionales no valorados en este experimento.

En este sentido, el Experimento 2b, nos permite, determinar con suficiente entidad que, la inclusión de niveles elevados de lignina en dietas fibrosas durante la recría no mejoran ni la capacidad de ingestión, ni el estatus metabólico y corporal durante la lactación temprana, ni la competencia del oocito y del embrión en las conejas primíparas inseminadas en el día 11 post-parto. Aunque se requieren estudios más específicos al respecto que expliquen las discordancias encontradas.

Los hallazgos de los experimentos anteriores, señalan que los niveles plasmáticos de leptina están correlacionados con las reservas energéticas de las conejas, y que esta hormona parece ser uno de los factores endocrinos esenciales en las interrelaciones complejas que se producen entre el sistema reproductor y el estatus nutricional de los animales y las personas a través de sus receptores (Cunningham *et al.*, 1999). De hecho, se ha observado que las mujeres obesas o excesivamente delgadas presentan problemas reproductivos y una respuesta peor a la estimulación ovárica en los tratamientos de reproducción asistida. De todo ello, surgió la necesidad de profundizar en las implicaciones

directas de esta hormona sobre la maduración *in vitro* de los oocitos, utilizando a la coneja como modelo animal lo que nos llevó a realizar el estudio correspondiente al último capítulo de la presente Memoria, el **Experimento 3**.

Los resultados corroboraron, en primer lugar, que el receptor de la leptina se encontraba ampliamente distribuido en los diferentes compartimentos ováricos, de acuerdo a los resultados anteriormente descritos en conejas pseudo-gestantes (Zerani *et al.*, 2004) y en otras especies donde se ha observado la presencia de ambas formas del Ob-R (mujer: Karlsson *et al.* 1997; rata: Zamorano *et al.* 1997; ratona: Matsuoka *et al.* 1999; cerda: Craig *et al.*, 2004). La estructura altamente conservada del receptor de la leptina y su amplia distribución en el organismo evidencian la importancia fisiológica de esta hormona, demostrando que actúa sobre la función reproductiva y particularmente a nivel ovárico (Moschos *et al.*, 2002) durante el periodo preovulatorio (Cioffi *et al.*, 1997).

Respecto al oocito, en otras especies se ha sugerido que la leptina, asociada con otros factores de crecimiento y hormonas en el medio, podría estar implicada en la reorganización del citoesqueleto del oocito, lo cual afectaría a la segregación cromosómica y al movimiento y distribución adecuada de los orgánulos del citoplasma durante su maduración (Sun y Schatten; 2006; Suzuki *et al.*, 2009). En nuestro trabajo, cuando se maduraron los complejos cúmulo-oocito con diferentes concentraciones de leptina (1-100 ng/ mL) en un medio base, encontramos que, esta hormona por si sola mejoró la maduración nuclear pero no la maduración citoplasmática, íntimamente relacionada con la migración de los gránulos corticales. Otros autores tampoco han observado ninguna influencia de la leptina sobre la maduración de oocitos de ratona (Swain *et al.*, 2004), ni de cerda (Suzuki *et al.*, 2009), o sobre la proporción de oocitos poliespérmicos en vacas (Paula-Lopes *et al.*, 2007). En este mismo sentido, en estudios iniciales, Runner and Gates (1954), determinaron que los oocitos de ratonas deficientes en leptina (*ob/ob*) podían desarrollarse hasta embrión, postulando que la causa de infertilidad de estos animales inducida por la ausencia de leptina posiblemente no era debida a un defecto en el oocito. Sin embargo, en otros estudios efectuados en condiciones *in vitro* han sugerido que la leptina mejora la maduración nuclear y citoplasmática en diferentes especies animales (ratona: Matsuoka *et al.* 1999; Ryan *et al.* 2002; cerda: Craig *et al.* 2004; Kun *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008; vaca: Boelhauve *et al.* 2005; Paula-Lopes *et al.* 2007; Van Tol *et al.*, 2008) aunque las concentraciones en las que ejerce su efecto beneficioso difieren en función de la especie y del medio de cultivo utilizado.

En este sentido, en la mayor parte de los trabajos realizados para valorar el efecto de la leptina sobre la maduración, los medios fueron suplementados con gonadotropinas, factores de crecimiento o fluido folicular que podrían estar aumentando la sensibilidad de los COC a la leptina, dando lugar a efectos beneficiosos y/o sinérgicos sobre la maduración de los

oocitos, sin tener en cuenta las interacciones entre estos factores. Sin embargo, en nuestro estudio para evitar posibles influencias no debidas a la leptina, se utilizó exclusivamente un medio de maduración sin ningún suplemento que pudiera interactuar con dicha hormona y, al igual que en el trabajo realizado por Van Tol *et al.* (2008), en el cuál tampoco observaron ninguna influencia de la leptina por sí misma sobre la maduración citoplasmática a las concentraciones utilizadas en este estudio.

Además, ninguna de las concentraciones de leptina empleadas indujo a un incremento de la secreción esteroidogénica de estradiol y progesterona de los complejos cúmulo-oocito durante la maduración *in vitro*. Sin embargo, sí se observó un aumento notable de estradiol en el medio suplementado con FCS respecto a los medios sin suero, debido a que en su composición existen factores que podrían estar ejerciendo este efecto como ya ha sido descrito en la ratona por otros investigadores (Vanderhyden y Tonary, 1995). Por lo tanto, bajo nuestras condiciones experimentales, estos resultados nos sugieren que, la leptina no aumenta la capacidad de secreción esteroidogénica de los complejos cúmulo-oocito y que la estimulación que ejerce sobre la maduración nuclear no parece estar asociada con variaciones en la producción de dichos esteroides, de acuerdo también con estudios previos (rata: Lieberman *et al.*, 1976; Moor, 1988; cerda: Dode y Graves, 2002; 2003; oveja: Shirazi y Moalemian, 2007). Sin embargo, el incremento significativo en la secreción de estradiol podría estar implicado en el aumento de la tasa de maduración citoplasmática que se observó en el medio suplementado con FCS, conforme a lo señalado en otros trabajos (vaca: Younis *et al.*, 1989; Sirotkin, 1992; mujer: Tesarik y Mendoza, 1997).

En este último estudio, además, se pretendió dilucidar cuáles podían ser las posibles vías de señalización intracelular utilizadas por la leptina durante la maduración de los oocitos. Así, se comprobó que en presencia de los inhibidores de las vías de señalización de las MAPK y de las STAT3, los oocitos madurados con leptina mostraron índices de maduración nuclear inferiores que aquellos en los que no se incluyeron ambos inhibidores. En ausencia de leptina, la maduración nuclear no se modificó. De acuerdo con nuestros resultados, en otras especies animales otros autores han señalado que el efecto de la leptina sobre la maduración *in vitro* se realizaba a través de la activación de la señal de las MAPK en los oocitos de la cerda (Craig *et al.*, 2004), o mediante las STAT3 en los de la ratona (Matsuoka *et al.*, 1999) y en la vaca (Paula-Lopes *et al.*, 2007). En este último caso, los autores puntualizan que la leptina actúa principalmente sobre las células del cúmulo mediante la isoforma larga del Ob-R. Esta forma del receptor posee todos los dominios intracelulares necesarios para activar tanto factores de transcripción STAT3 como la vía de las MAPK (Lee *et al.*, 1996; Bjorbaek *et al.*, 1997) mientras que la forma corta solo puede mediar el efecto de la leptina a través de la activación de las MAPK (Bjorbaek *et al.*, 1997; Tartaglia, 1997). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la acción de la leptina sobre la

maduración nuclear de los oocitos de coneja podría estar mediada, al menos, por la forma larga del Ob-R, aunque son necesarios más estudios al respecto para comprobar esta hipótesis. Finalmente y como se esperaba, la maduración citoplasmática no se vio reducida significativamente cuando se incluyeron en los medios, con o sin leptina, ambos inhibidores. Por lo tanto, en los oocitos de coneja, la migración total de los gránulos corticales no parece estar mediada por la activación que ejerce la leptina sobre las proteínas MAPK y STAT3. Estos resultados concordan con los de otros autores (Bates *et al.*, 2003), que demostraron que si se interrumpía la vía de las STAT3 los ratones eran obesos pero fértiles. De hecho, la inhibición de esta vía de señalización parece ser letal para los embriones (Takeda *et al.*, 1997), pero no afecta a la maduración del oocito (Swain *et al.*, 2004). Sin embargo, en nuestro estudio, los niveles elevados de ambos inhibidores en el medio de maduración aumentaron la tasa de gránulos corticales migrados anormalmente. Esto podría ser debido a un posible efecto citotóxico de los inhibidores sobre el oocito, aunque no se ha observado en otros tipos celulares a las concentraciones utilizadas en este estudio (Jaleel *et al.*, 2004; Mansour *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Saxena *et al.*, 2007).

Por lo tanto, los resultados del Experimento 3 presentan la primera evidencia de que la leptina mejora la maduración nuclear en el oocito de coneja, y que este efecto beneficioso está mediado por la activación de las vías de las MAPK y de las STAT3. Sin embargo, esta hormona, en las condiciones experimentales definidas, utilizando medios de maduración no suplementados con otros compuestos, no parece ejercer ninguna influencia sobre la migración total de los gránulos corticales de los oocitos, ni sobre la capacidad esteroidogénica de los COC de coneja madurados *in vitro*.

En base a estos resultados, creemos que el conocimiento generado en la presente Memoria ayudará en la aplicación de estrategias de manejo reproductivo y nutricional que permitan solucionar, o minimizar, los problemas que afectan a las conejas primíparas cuando se encuentran sometidas a una producción con elevados requerimientos energéticos. Por otro lado, se ponen de manifiesto las posibles implicaciones de la leptina, una de las hormonas que se sugiere como clave en el binomio estatus nutricional-reproductivo, sobre la maduración los oocitos, utilizando la coneja como modelo experimental. Así, la lactación, el estrés metabólico y la carencia proteica y de grasa corporal en el día 11 post-parto, influyen negativamente sobre la calidad folicular y la competencia del oocito y, por lo tanto, el éxito reproductivo se reduce considerablemente. En base a estos parámetros, los resultados muestran que las estrategias nutricionales durante la recría basadas en el incremento del contenido en lignina de las dietas fibrosas, no son un manejo adecuado que mejore el estatus ovárico y embrionario durante la lactación temprana. Además, la IA en ese momento

requiere de un tratamiento de sincronización de celo. Esta Memoria proporciona una base fisiológica que sustenta que el destete transitorio de la camada es un método de elección alternativo al tratamiento hormonal con eCG ya que mejora el estatus ovárico en la misma medida. Aún así, la utilización de un ritmo reproductivo semi-intensivo para las conejas primíparas no es el mas apropiado ya que el día 11 post-parto no han recuperado suficientemente las reservas corporales, lo cual afecta considerablemente la calidad de sus folículos y de sus oocitos. Por lo tanto, los resultados fisiológicos obtenidos abogan por la realización de la IA después del destete como alternativa real de manejo reproductivo, al menos, en las conejas primíparas.

6. CONCLUSIONES

1. La sincronización del estro mediante la separación transitoria de la camada durante 24 horas puede ser un procedimiento alternativo al tratamiento hormonal con eCG en conejas primíparas lactantes inseminadas en el día 11 *post-parto* puesto que disminuye la tasa de atresia folicular y mejora la calidad citoplasmática de los oocitos respecto al tratamiento hormonal con eCG.
2. El ritmo extensivo, inseminando a las conejas primíparas en el periodo post-destete, es una elección de manejo reproductivo aconsejable y adaptado a la fisiología de esta especie ya que las conejas presentan una mejora considerable en la composición corporal y en el estatus metabólico en el día 32 post-parto, relacionado con una reducción de la tasa de atresia folicular y una mejora en la calidad de los oocitos madurados *in vitro*, así como en los valores de fertilidad y prolificidad.
3. La inclusión de niveles elevados de lignina en dietas fibrosas durante la recría generan un aumento en la capacidad de ingestión de las conejas nulíparas pero disminuye las reservas energéticas y los niveles de leptina en el momento de su primera IA, al igual que la capacidad de desarrollo *in vitro* de los embriones y la fertilidad.
4. La inclusión de niveles elevados de lignina en dietas fibrosas durante la recría no mejora a medio plazo la capacidad de ingestión, ni el estatus metabólico y corporal durante la lactación temprana, ni la competencia del oocito y del embrión en las conejas primíparas inseminadas en el día 11 post-parto, no considerándose una estrategia nutricional apropiada de aplicación en las granjas cunícolas.
5. La leptina estimula la maduración nuclear del oocito mediante la activación de las vías intracelulares de las MAPK y de las STAT3, pero no influye de manera significativa en la tasa de migración de los gránulos corticales de los oocitos, ni en la secreción esteroidogénica de los complejos cúmulo-oocito de coneja madurados *in vitro*.

7. CONCLUSIONS

1. A 24h-transient weaning may be a valuable non-hormonal alternative method for oestrus synchronization in primiparous lactating rabbit does inseminated in the early *postpartum* period, since follicular atresia is lower than with hormonal treatment (eCG) and oocyte competence is enhanced in terms of *in vitro* cortical granule migration.

2. Insemination after weaning is the best management for primiparous does because it fits with the metabolic status and reproductive physiology of such animals. This procedure also improves their estimated body composition and metabolic status in Day 32 *postpartum*, lowering their atresia rate and enhancing *in vitro*-matured oocyte quality, conception rate and prolificacy.

3. High-lignin diets administered in the rearing period enhanced feed intake, but such diets reduce serum leptin levels at AI time, energy reserves as well as *in vitro* embryo survival, and thus conception rate.

4. High-lignin-based diet during the rearing period does not lead to reproductive physiology enhancement in primiparous rabbit does. This diet does not improve feed intake, metabolic status or body composition during the early lactation period, neither oocyte nor embryo competence in artificially-inseminated rabbits at 11 days *postpartum*.

5. Leptin stimulated nuclear maturation of oocytes through MAPK and STAT3 intracellular signalling pathway activation. However, it did not significantly influence oocyte cortical granule migration or steroidogenic secretion of cumulus complex of *in vitro*-matured rabbit oocytes.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, A. L. & Ducibella, T. 2001. Calcium and the control of mammalian cortical granule exocytosis. *Front Biosci.*, 1, Review.
- Adams, C. E. 1960. Studies on prenatal mortality in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*: the amount and distribution of loss before and after implantation. *J. Endocrin.*, 19, 325-344.
- Agarwal, S. K., Vogel, K., Weitsman, S. R. & Magoffin, D. A. 1999. Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 1072-1076.
- Ainsworth, L., Tsang, B. K., Downey, B. R., Marcus, G. J. & Armstrong, D. T. 1980. Interrelationships between follicular fluid steroid levels, gonadotropic stimuli, and oocyte maturation during preovulatory development of porcine follicles. *Biol. Reprod.*, 23, 621-627.
- Akira, S. 1999. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem. Cells*, 17, 138-146.
- Ali, A. A., Bilodeau, J. F. & Sirard, M. A. 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59, 939-949.
- Alvariño, J. M. R. 1993. *Control de la reproducción en el conejo*. Mundi-Prensa, España.
- Alvariño, J. M. R., Del Arco, J. A. & Bueno, A. 1998. Effects of mother-litter separation on reproductive performance of lactating rabbits females inseminated on day 4 or 11 post partum. *World Rabbit Science*, 6, 191-194.
- Alvariño, J. M. R. & Ubilla, E. 1993. *Fisiología de la reproducción en la hembra*. Ediciones mundiprensa, España.
- Andersen, C. Y. 1993. Characteristics of human follicular fluid associated with successful conception after in vitro fertilization. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 1227-1234.
- Antczak, M. & Van Blerkom, J. 1997. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo. *Molecular human reproduction*, 3, 1067-1086.
- Assey, R. J., Hyttel, P., Roche, J. F. & Boland, M. 1994. Oocyte structure and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. *Mol. Reprod. Dev.*, 39, 8-16.
- Barkan, D., Jia, H., Dantes, A., Vardimon, L., Amsterdam, A. & Rubinstein, M. 1999. Leptin modulates the glucocorticoid-induced ovarian steroidogenesis. *Endocrinology*, 140, 1731-1738.
- Barrett, C. B. & Powers, R. D. 1993. Progestins inhibit murine oocyte meiotic maturation in vitro. *J. Exp. Zool.*, 265, 231-239.
- Bates, S. H., Stearns, W. H., Dundon, T. A., Schubert, M., Tso, A. W., , W., Y., Banks, A. S., Lavery, H. J., Haq, A. K., Maratos-Flier, E., Neel, B. G., Schwartz, M. W. & Myers, M. G. 2003. STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction. *Nature*, 421, 856-859.
- Batta, S. K. & Knudsen, J. F. 1980. Calcium concentration in cumulus enclosed oocytes of rats after treatment with pregnant mares serum. *Biol. Reprod.*, 22, 243-246.
- Beker, A. R., Colenbrander, B. & Bevers, M. M. 2002. Effect of 15beta-estradiol on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, 58, 1663-73.
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L. & Steinmetz, R. W. 1996. Extra-pituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews*, 17, 639-669.
- Benos, D. J., Biggers, J. D., Balaban, R. S., Mills, J. W. & Overström, E. W. 1985. Developmental aspects of sodium-dependent transport processes of preimplantation rabbit embryos. *Soc. Gen. Physiol. Ser.*, 39, 211-235.
- Bhattacharya, S., Basu, D., Ak, N. & A., P. 2007. Molecular mechanism of oocyte maturation. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*, 63, 45-55.
- Bjørbaek, C., Uotani, S., da Silva, B. & Flier, J. S. 1997. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor. *J. Biol. Chem.*, 272, 32686-32695.
- Blondin, P. & Sirard, M. A. 1995. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 41, 54-62.
- Boelhauve, M., Sinowatz, F., Wolf, E. & Paula-Lopes, F. F. 2005. Maturation of Bovine Oocytes in the Presence of Leptin Improves Development and Reduces Apoptosis of In Vitro-Produced Blastocysts. *Biol. Reprod.*, 73, 737-744.
- Boiti, C. 2004. Underlying physiological mechanism controlling the reproductive axis of rabbit does. *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress. Puebla (Méjico)*, 186-206.
- Boland, M. P., Lonergan, P. & O'Callaghan, D. 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, 55, 1323-1340.
- Bolet, G. & Fortun-Lamothe, L. 2002. Relationship between body condition and reproductive performance in rabbit does. *Proceeding of 3th Meeting of Workgroups 3 and 4. Ispra, Italy*, 23.
- Bonanno, A., Budetta, G., Alabiso, M. & Alicata, M. L. 1990. Effetti del trattamento PMSG-GnRH sull'efficienza delle coniglie. *Acta Med. Vet.*, 36, 441-451.

- Bonanno, A., Di Griola, A., Alabiso, M. & Boiti, C. 2002. Parity and number of repeated doe-litter separation treatments affect differently the reproductive performances of lactating does. *World rabbit Science*, 10, 63-70.
- Bonanno, A., Mazza, F., Di Grigoli, A. & Alicata, M. L. 2004. Effects of restricted feeding during rearing, combined with a delayed first insemination, on reproductive activity of rabbit does. *Proceedings of the 8th World rabbit Congress. Puebla (México)*, 224-230.
- Bonhoff, A. J. & Adams, C. E. 1985. Relationship of hormonally induced developmental changes in preovulatory follicles of the rabbit. *Lab. Anim.*, 19, 27-31.
- Boone, D. L., Yan, W. & Tsang, B. K. 1995. Identification of a deoxyribonuclease I-like endonuclease in rat granulosa and luteal cell nuclei. *Biol. Reprod.*, 53, 1057-65.
- Bourdillon, A., Chmitelin, F., Jarrin, D., Perez, V. & Rouillère, H. 1992. Effects of a eCG treatment on breeding results of artificially inseminated rabbits. *Proceedings of the 5th World Rabbit Congress. Corvallis (USA)*, 25-30.
- Boving, B. G. 1957. Rabbit egg coverings. *Anat. Rec.*, 127, 270.
- Braden, A. W. 1952. Properties of the membranes of rat and rabbit eggs. *Aust. J. Sci. Res. Ser. B*, 5, 460-471.
- Braden, A. W. & Austin, C. R. 1954. The number of sperms about the eggs in mammals and its significance for normal fertilization. *Aust. J. Biol. Sci.*, 7, 543-551.
- Brannian, J. D. & Hansen, K. A. 2002. Leptin and ovarian folliculogenesis: implications for ovulation induction and ART outcomes. *Semin. Reprod. Med.*, 20, 103-12.
- Brannian, J. D., Zhao, Y. & McElroy, M. 1999. Leptin inhibits gonadotrophin-stimulated granulosa cell progesterone production by antagonizing insulin action. *Hum. Reprod.*, 14, 1445-1448.
- Brecchia, G., Bonanno, A., Galeati, G., Federici, G., Maranesi, M., Gobetti, A., Zerani, M. & Boiti, C. 2006. Hormonal and metabolic adaptation to fasting: effects on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive performance of rabbit does. *Domestic Animal Endocrinology*, 31, 105-122.
- Britt, J. H. 1992. Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *Bovine Proc.*, 24, 39-43.
- Brunet, S. & Maro, B. 2005. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction*, 130, 801-811.
- Can, A. & Semiz, O. 2000. Diethylstilbestrol (DES)-induced cell cycle delay and meiotic spindle disruption in mouse oocytes during in-vitro maturation. *Mol. Hum. Reprod.*, 6, 154-62.
- Cano, P., Jiménez-Ortega, V., Alvarez, M. P., Alvario, M., Cardinali, D. P. & Esquifino, A. I. 2005. Effect of rabbit doe-litter separation on 24-hour changes of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and prolactin release in female and male suckling pups. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 27, 3-50.
- Cardinali, R., Dal Bosco, A., Bonanno, A., Di Grigoli, A., Rebollar, P. G., Lorenzo, P. L. & Castellini, C. 2008. Connection between body condition score, chemical characteristics of body and reproductive traits of rabbit does. *Livestock Science*, 116, 209-215.
- Carneiro, G. F., Liu, I. K., Hyde, D., Anderson, G. B., Lorenzo, P. L. & Ball, B. A. 2002. Quantification and distribution of equine oocyte cortical granules during meiotic maturation and after activation. *Mol. Reprod. Dev.*, 63, 451-458.
- Carney, E. W. & Foote, R. H. 1990. Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 89, 543-551.
- Castellini, C., Canali, C. & Boiti, C. 1998. Effect of mother-litter separation for 24 hours by closing the nestbox or change of cage, on rabbit doe reproductive performance. *World Rabbit Science.*, 6, 199-203.
- Castellini, C., Dal Bosco, A. & Cardinali, R. 2006. Long effect of post-weaning rhythm on the body fat and performance of rabbit doe. *Reproductive Nutrition Development*, 46, 195-204.
- Castellini, C., Dal Bosco, A. & Mugnai, C. 2003. Comparison of different reproduction protocols for rabbit does: effect of litter size and mating interval. *Livestock Production Science*, 83, 131-139.
- Cervera, C., Fernández-Carmona, J., Viudes, P. & Blas, E. 1993. Effect of remating interval and diet on the performance of female rabbit and their litters. *Animal Production*, 56, 399-405.
- Cervera, C. & Pascual, J. J. 2006. Manejo de la alimentación de las conejas reproductoras. XXXI *Symposium de Cunicultura de la Asociación Española de Cunicultura, Lorca, España.*, 225-241.
- Chagas, L. M., Bass, J. J., Blache, D., Burke, C. R., Kay, J. K., Lindsay, D. R., Lucy, M. C., Martin, G. B., Meier, S., Rhodes, F. M., Roche, J. R., Thatcher, W. W. & Webb, R. 2007. New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 90, 4022-4032.
- Channing, C. P., Bae, I. H., Stone, S. L., Anderson, L. D., Edelson, S. & Fowler, S. C. 1981. Porcine granulosa and cumulus cell properties. LH/hCG receptors, ability to secrete progesterone and ability to respond to LH. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 22, 359-370.

- Chen, C., Chang, Y. C., Liu, C. L., Liu, T. P., Chang, K. J. & Guo, I. C. 2007. Leptin induces proliferation and antiapoptosis in human hepatocarcinoma cell by up-regulating cyclin D1 and down-regulating Bax via a Janus kinase 2-linked pathway. *Endocrine-Related Cancer*, 14, 531-529.
- Cherr, G. N., Drobnis, E. Z. & Katz, D. F. 1988. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in the hamster egg. *J. Exp. Zool.*, 246, 81-93.
- Chian, R. C., Ao, A., Clarke, H. J., Tulandi, T. & Tan, S. L. 1999. Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during culture in vitro. *Fertil. Steril.*, 7, 61-6.
- Chilliard, Y., Delavaud, C. & Bonnet, M. 2005. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 29, 3-22.
- Cia, M. C., Edwards, S. A., Glasgow, V. L., Shanks, M. & Fraser, H. 1998. Modification of body composition by altering the dietary lysine to energy ratio during rearing and the effect on reproductive performance of gilts. *Anim. Sci.*, 66, 457-463.
- Cioffi, J., Van Blerkom, J., Antczak, M., Shafer, A., Wittmer, S. & Snodgrass, H. R. 1997. The expression of leptin and its receptors in pre-ovulatory human follicles. *Molecular Human Reproduction*, 3, 467-472.
- Coleman, D. L. 1978. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia*, 14, 141-148.
- Colledge, W. H., Carlton, M. B., Udy, G. B. & Evans, M. J. 1994. Disruption of c-mos causes parthenogenetic development of unfertilized mouse eggs. *Nature*, 370, 65-68.
- Cooper, G. W. & Bedford, J. M. 1971. Charge density change in the vitelline surface following fertilization of the rabbit egg. *J. Reprod. Fertil.*, 25, 431-436.
- Corchado, V., Rebollar, P. G., Pereda, N., Rosato, M. P., Iaffaldano, N., García Rebollar, P. & Nicodemus, N. 2006. Estimación de la composición corporal de las conejas reproductoras mediante la impedancia bioeléctrica (BIA): Primeros resultados. *XXXI Symposium de Cunicultura de la Asociación Española de Cunicultura, Lorca, España*, 59-66.
- Corino, C., Mouro, J., Magni, S., Pastorelli, G. & Rosi, F. 2002. Influence of dietary conjugated linoleic acid on growth, meat quality, lipogenesis, plasma leptin and physiological variables of lipid metabolism in rabbits. *J. Anim. Sci.*, 80, 1020-1028.
- Craig, J., Zhu, H., Dyce, P. W., Petrik, J. & Li, J. 2004. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology*, 145, 5355-5363.
- Cunningham, M. J., Clifton, D. K. & Steiner, R. A. 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biol. Reprod.*, 60, 216-222.
- Danforth, D. R. 1995. Endocrine and paracrine control of oocyte development. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 172, 747-752.
- Das, R. & Vonderhaar, B. K. 1995. Transduction of prolactin's (PRL) growth signal through both long and short forms of the PRL receptor. *Molecular Endocrinology*, 9, 1750-1759.
- Daza, A., Mateos, A., Ovejero, J. & López Bote, C. J. 2006. Prediction of body composition Iberian pig by means of bioelectrical impedance. *Meat Science*, 72, 43-46.
- De Blas, C., García, J. & Carabaño, R. 1999. Role of fibre in rabbit diets. A review. *Ann. Zootech.*, 48, 3-13.
- De Blas, J. C., Taboada, E., Mateos, G. G., Nicodemus, N. & Méndez, J. 1995. Effect of substitution of starch for fiber and fat in isoenergetic diets on nutrient digestibility and reproductive performance of rabbits. *J. Anim. Sci.*, 73, 1131-1137.
- Deichmiller, M. P. & Dixon, F. J. 1960. The metabolism of serum proteins in neonatal Rabbits. *Journ. Gral. Physiol.*, 43, 1047-1059.
- Deker, N. 2005. Cellular, biochemical and molecular mechanisms regulating oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 234, 19-25.
- Delavaud, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Bocquier, F., Kann, G. & Chilliard, Y. 2002. Plasma leptin concentration in adult cattle: effects of breed, adiposity, feeding level, and meal intake. *J. Anim. Sci.*, 80, 1317-1328.
- Denker, H. W. & Gerdes, H. J. 1979. The dynamic structure of rabbit blastocyst coverings. I. Transformation during regular preimplantation development. *Anat. Embryol.*, 157, 15-34.
- Depoortere, I., Thijs, T., Keith Jr., J. & Peeters, T. L. 2004. Treatment with interleukin-11 affects plasma leptin levels in inflamed and non-inflamed rabbits. *Regul. Pept.*, 15, 149-156.
- Dode, M. A. N. & Graves, C. 2002. Involvement of steroid hormones on in vitro maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, 57, 811-821.
- Dominguez, M. M. 1995. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology*, 43, 1405-1418.
- Ducibella, T., Anderson, E., Albertini, D. F., Aalberg, J. f. & Rangarajan, S. 1988. Quantitative studies of

- changes in cortical granule number and distribution in the mouse oocyte during meiotic maturation. *Developmental Biology*, 130, 184-197.
- Ducibella, T., Kurasawa, S., Duffy, P., Kopf, G. S. & Schultz, R. M. 1993. Regulation of the polyspermy block in the mouse egg: maturation- dependent differences in cortical granule exocytosis and zona pellucida modifications induced by inositol 1,4,5-trisphosphate and an activator of protein kinase C. *Biol. Reprod.*, 48, 1251-1257.
- Díaz, P., Rodríguez, J. M., Gosálvez, L. F. & Román, M. R. 1987. Cyclic ovarian activity in post-partum rabbits. *J. Appl. Rabbit Res.*, 10, 122-125.
- Edwards, R. G. 1965. Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 208, 349-51.
- Eiben, C., Kustos, K., Kenessey, A., Virag, G. & Szendro, Z. 2001. Effect of different feed restrictions during rearing on reproduction performance in rabbit does. *World Rabbit Science*, 9, 9-14.
- Eppig, J. 2001. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122, 829-838.
- Erickson, G. F. & Ryan, K. J. 1975. The effect of LH/FSH, dibutyl cyclic AMP, and prostaglandins on the production of estrogens by rabbit granulosa cells in vitro. *Endocrinology*, 97, 108-113.
- Erickson, G. F. & Ryan, K. J. 1976. Stimulation of testosterone production in isolated rabbit testis tissue by LH/FSH, dibutyl cyclic AMP, PGF_{2a} and PGE₂. *Endocrinology*, 99, 452-458.
- Fair, T. 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim. Reprod. Sci.*, 78, 203-216.
- Fedorcsak, P. & Storeng, R. 2003. Effects of leptin and leukaemia inhibitory factor on preimplantation development and STAT3 signalling of mouse embryos in vitro. *Biol. Reprod.*, 69, 1531-1538.
- Ferguson, E. M., Ashworth, C. J., Edwards, S. A., Hawkins, N., Hepburn, N. & Hunter, M. G. 2003. Effect of different nutritional regimens before ovulation on plasma concentrations of metabolic and reproductive hormones and oocyte maturation in gilts. *Reproduction*, 126, 61-71.
- Ferguson, E. M., Slevin, J., Edwards, S. A., Hunter, M. G. & Ashworth, C. J. 2006. Effect of alterations in the quantity and composition of the pre-mating diet on embryo survival and foetal growth in the pig. *Anim. Reprod. Sci.*, 96, 89-103.
- Ferguson, E. M., Slevin, J., Hunter, M. G., Edwards, S. A. & Ashworth, C. J. 2007. Beneficial effects of a high fibre diet on oocyte maturity and embryo survival. *Reproduction*, 133, 433-439.
- Fernández-Carmona, J., Pascual, J. J. & Cervera, C. 2000. The use of fat in rabbit diets. *World Rabbit Science*, 8, 29-59.
- Ferreira, E. M., Vireque, A. A., Adona, P. R., Meirelles, F. V., Ferriani, R. A. & Navarro, P. A. A. S. 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71, 836-848.
- Feugier, A. & Fortun-Lamothe, L. 2006. Extensive reproductive rhythm and early weaning improve body condition and fertility of rabbit does. *Animal Research*, 55, 454-470.
- Fleming, M. W., Rhodes, R. C. & Dailey, R. A. 1984. Compensatory responses after unilateral ovariectomy in rabbits. *Biol. Reprod.*, 30, 82-86.
- Fléchon, J. E., Huneau, D., Solari, A. & Thibault, C. 1975. Reaction corticale et blocage de la polyspermie dans l'œuf de lapine. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 15, 9-18.
- Fortun, L. 1994. Influence of progesterone supplementation on foetal survival in concurrently pregnant and lactating does. *Reprod Nutr Dev*, 34, 125-131.
- Fortun, L., Bolet, G. & Lebas, F. 1994. Influence of prolactin on foetal survival in rabbit does. *Animal Reproduction Science*, 66, 263-269.
- Fortun-Lamothe, L. 1997. Effect of dietary fat on reproductive performance on rabbit does: A review. *World Rabbit Science*, 5, 33-38.
- Fortun-Lamothe, L. 2006. Energy balance and reproductive performance in rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.*, 93, 1-15.
- Fortun-Lamothe, L. & Bolet, G. 1995. Les effets de la lactation sur les performances de reproduction chez la lapine. *Prod. Anim.*, 8, 49-56.
- Fortun-Lamothe, L., Lamboley-Gaüzère, B. & Bannelier, C. 2002. Prediction of body composition in rabbit females using total body electrical conductivity (TOBEC). *Livest. Prod. Sci.*, 78, 133-142.
- Fortun-Lamothe, L. & Prunier, A. 1999. Effects of lactation, energetic deficit and remating interval on reproductive performance on primiparous rabbit does. *Animal Reproduction Science*, 55, 289-298.
- Foster, D. L. & Nagatani, S. 1999. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. *Biology of Reproduction*, 60, 205-215.
- Fraser, L. R., Dandekar, P. V. & Gordo, M. K. 1972. Loss of cortical granules in rabbit eggs exposed to spermatozoa in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 29, 295-297.
- Friedman, J. M. & Halaas, J. L. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395,

763-770.

- Frühbeck, G. 2006. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem. J.*, 393, 7-20.
- Fukui, Y., Fukushima, M., Terawaki, Y. & Ono, H. 1982. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation in vitro. *Theriogenology*, 18, 161-175.
- García-García, R. M., Arias-Álvarez, M., Rebollar, P. G., Revuelta, L. & Lorenzo, P. L. 2008. Influence of different reproductive rhythms on serum estradiol, testosterone levels, features of follicular population and atresia rate, and oocyte maturation in controlled suckling rabbits. *Anim. Reprod. Sci.*, Doi:10.1016/j.anireprosci.2008.10.007.
- García, J., Carabaño, R. & De Blas, C. 1999. Effect of fiber source on cell wall digestibility and rate of passage in rabbits. *Journal Animal Science*, 77, 898-905.
- García-García, R. M., Arias-Álvarez, M., García-Palencia, P., Revuelta, L., Sánchez-Maldonado, B., Rebollar, P. G. & Lorenzo, P. L. 2007a. Localización del receptor de prolactina en el ovario de conejas en diferentes estado fisiológicos. *Actas de II XXXII Symposium de ASESU. Jornadas Ibéricas sobre Cunicultura. Vila Real (Portugal). Boletín de Cunicultura.*, 151, 41-44.
- García-García, R. M., Arias-Álvarez, M., Revuelta, L., Rebollar, P. G. & Lorenzo, P. L. 2007b. Features of ovarian follicular population of nursing rabbits under different reproductive rhythms. *Annual Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE). Alghero, Sardinia.*, 166.
- Gardner, D. K. & Lane, M. 1998. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum- free media. *Hum. Reprod.*, 13, 148-159.
- Gavrieli, Y. S. & Ben-Sasson, S. A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119, 493-501.
- Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M. H. & Skoda, R. C. 1996. Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 6231-6235.
- Gidenne, T. 2003. Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livest. Prod. Sci.*, 81, 105-117.
- Gidenne, T. & Perez, J. M. 1994. Apports de lignines et alimentation du lapin en croissance. I. Conséquences sur la digestion et le transit. *Ann. Zootech.*, 43, 313-322.
- Gondos, B. 1969a. The ultrastructure of granulose cells in the newborn rabbit ovary. *Anat. Rec.*, 165, 67-77.
- Gondos, B. 1969b. Ultrastructure of the germinal epithelium during oogenesis in the rabbit. *J. Exp. Zool.*, 172, 465-479.
- Gondos, B. & Zamboni, L. 1969. Ovarian development: the functional importance of germ cell interconnections. *Fertil. Steril.*, 20, 176-189.
- González, V. 2007. Efecto del ritmo de cubrición y momento de destete sobre el crecimiento de gazapos en cebo. *Proyecto Fin de Carrera*. EUITA -UPM.
- Gordo, A. C., He, C. L., Smith, S. & Fissore, R. A. 2001. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 59, 106-114.
- Gordon, M., Fraser, L. R. & , D., P.V. 1975. The effect of rutenium red and concavalin A on the viteline surface of fertilized and unfertilised rabbit ova. *Anat. Rec.*, 181, 95-112.
- Gotoh, Y. & E., N. 1995. Activation mechanism and function of the MAP kinase cascade. *Mol. Reprod. Dev.*, 42, 486-492.
- Greve, T., Callesen, H., Hyttel, P., Hoier, R. & Assey, R. 1995. The effect of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology*, 43, 41-50.
- Gulyas, B. J. 1974a. Cortical granules in artificially activated (parthenogenetic) rabbit eggs. *Am. J. Anat.*, 140, 577-582.
- Gulyas, B. J. 1974b. Electron microscopic observations on advanced stages of spontaneous polyspermy in rabbit zygotes. *Anat. Rec.*, 179, 285-296.
- Guthrie, H. D., Bolt, D. J. & Cooper, B. S. 1990. Effects of gonadotropin treatment on ovarian follicle growth and granulosa cell aromatase activity in prepuberal gilts. *J. Anim Sci.*, 68, 3719-3726.
- Hafez, E. S. E. 1968. Some maternal factors causing post-implantation mortality in the rabbit. *VI Cong. Reprod. Insem. Artif., Paris.*, 92.
- Hamada, Y., Schlaff, S., Kobayashi, Y., Santulli, R., Wright, K. H. & Wallach, E. E. 1980. Inhibitory effect of prolactin on ovulation in the in vitro perfused rabbit ovary. *Nature*, 285, 161-163.
- Hamm, M. L., Bhat, G. K., Thompson, W. E. & Mann, D. R. 2004. Folliculogenesis is impaired and granulosa cell apoptosis is increased in leptin-deficient mice. *Biology of Reproduction*, 71, 66-72.
- Han, B. Z., Lan, G. C., Wu, Y. G., Han, D., Feng, W. G., Wang, J. Z. & Tan, J. H. 2006. Interactive effects of granulosa cell apoptosis, follicle size, cumulus-oocyte complex morphology, and cumulus expansion on the developmental competence of goat oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Reproduction*, 132, 749-758.

- Harris, S. E., Gopichandran, N., Picton, H. M., Leese, H. J. & Orsi, N. M. 2005. Nutrient concentrations in murine follicular fluid and the female reproductive tract. *Theriogenology*, 64, 992-1006.
- Hashimoto, N., Watanabe, N., Furuta, Y., Tamemoto, H., Sagata, N., Yokoyama, M., Okazaki, K., Nagayoshi, M., Takeda, N., Ikawatll, Y. & Aizawai, S. 1994. Parthenogenetic activation of oocytes in c-mos-deficient mice. *Nature*, 370, 68-71.
- Henry, M. A., Rawlins, R. G., Radwanska, E. & Fahy, M. M. 1997. Oocyte maturation in rabbits: effects of calmodulin inhibitors. *Zygote*, 5, 255-260.
- Henson, P. M., Bratton, D. L. & Fadok, V. 2001. Apoptotic cell removal. *Curr. Biol.*, 11, 795-805.
- Hill, M. & White, W. E. 1933. The growth and regression of follicles in the oestrus rabbits. *J. Physiol.*, 80, 174-178.
- Hillensjö, T., Magnusson, C., Svensson, U. & Thelander, H. 1981. Effect of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone on progesterone synthesis by cultured rat cumulus cells. *Endocrinology*, 108, 1920-1944.
- Hirshfield, A. N. & Midgley, A. R. 1978. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol. Reprod.*, 19, 597-605.
- Holt, J. A., Lorincz, M. A. & Lyttle, C. R. 1981. Estrogen receptor in rabbit ovaries and effects of antiestrogen on progesterone production. *Endocrinology*, 108, 2308-2315.
- Hombria, J. C. & Brown, S. 2002. The fertile field of Drosophila Jak/STAT signalling. *Curr. Biol.*, 12, 569-575.
- Hong, J. & Lee, E. 2007. Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development. *Theriogenology*, 68, 728-735.
- Hoodbhoy, T. & Talbot, P. 1994. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. *Mol. Reprod. Dev.*, 39, 439-448.
- Hosoe, M. & Shioya, Y. 1997. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by cumulus complex. *Zygote*, 5, 371-376.
- Hosoi, T., Matsunami, N., Nagahama, T., Okuma, Y., Ozawa, K., Takizawa, T. & Nomura, Y. 2006. 2-Aminopurine inhibits leptin receptor signal transduction. *Eur. J. Pharmacol.*, 553, 61-66.
- Huang, H. F., B, W., Yang, X. F., Luo, Q. & Sheng, J. Z. 2005. Nitric oxide mediates inhibitory effect of leptin on insulin-like growth factor I augmentation of 17 β -estradiol production in human granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 72, 102-106.
- Hughes, F. M. & Gorospe, W. C. 1991. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*, 129, 2415-2422.
- Hussein, M. R. 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum. Reprod. Update*, 11, 162-177.
- Hutt, K. J., McLaughlin, E. A. & Holland, M. K. 2006. Primordial follicle activation and follicular development in the juvenile rabbit ovary. *Cell Tissue Res.*, 326, 809-822.
- Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H. & Greve, T. 1997. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, 47, 23-32.
- International, A. 2000. Official Methods of Analysis. 17th Ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg MD, USA.
- Jabbour, H. N. & Kelly, P. A. 1997. Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific regulation of prolactin function. *Rev. Reprod.*, 2, 14-18.
- Jaleel, M., Shenoy, A. R. & Visweswariah, S. S. 2004. Tyrphostins are inhibitors of guanylyl and adenylyl cyclases. *Biochemistry*, 43, 8247-8255.
- Jelinkova, L., Kubelka, M., Motlik, J. & Guerrier, P. 1994. Chromatin condensation and histone H1 kinase activity during growth and maturation of rabbits oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 37, 210-215.
- Jewgenow, K., Heerden, B. & Müller, K. 1999. In vitro development of individually matured bovine oocytes in relation to follicular wall atresia. *Theriogenology*, 51, 745-756.
- Jin, Y. X., Cui, X. S., Han, Y. J. & Kim, N. H. 2008. Leptin accelerates pronuclear formation following intracytoplasmic sperm injection of porcine oocytes: Possible role for MAP kinase inactivation. *Anim. Reprod. Sci.*
- Jolly, P. D., Tisdall, D. J., De'ath, G., Heath, D. A., Lun, S., Hudson, N. L. & McNatty, K. P. 1997. Granulosa cell apoptosis, aromatase activity, cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate response to gonadotropins, and follicular fluid steroid levels during spontaneous and induced follicular atresia in ewes. *Biol. Reprod.*, 56, 830-836.
- Jorritsma, R., Wensing, T., Kruip, T. A. M., Vos, P. L. A. M. & Noordhuizen, J. P. T. M. L. 2003. Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows. *Veterinary Research*, 34, 11-26.
- Kaji, E., Bornslaeger, E. A. & Schultz, R. M. 1987. Inhibition of mouse oocyte cyclic AMP

- phosphodiesterase by steroid hormones: a possible mechanism for steroid hormone inhibition of oocyte maturation. *J. Exp. Zool.*, 243, 489-493.
- Kane, M. T. 1975. Inhibition of zona shedding of rabbit blastocysts in culture by the presence of a mucin coat. *J. Reprod. Fertil.*, 44, 539-542.
- Kane, M. T. 1987. Minimal nutrient requirements for culture of one-cell rabbit embryos. *Biol. Reprod.*, 37, 775-778.
- Karamouti, M., Kollia, P., Karligiotou, E., Kallitsaris, A., Prapas, N., Kollios, G., Seferiadis, K., Vamvakopoulos, N. & Messinis, I. E. 2003. Absence of leptin expression and secretion by human luteinized granulosa cells. *J. Mol. Endocrinol.*, 31, 233-239.
- Karlach, V. 1987. The effect of FSH, LH, oestradiol-17 beta, and progesterone on cytoplasmic maturation of bovine follicular oocytes in vitro. *Folia Biol.*, 33, 258-265.
- Karlsson, C., Lindell, K., Svensson, E., Bergh, C., Lind, P., Billig, H., Carlsson, L. M. S. & Carlsson, B. 1997. Expression of Functional Leptin Receptors in the Human Ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82, 4144-4148.
- Kasuya, K. 1995. The process of apoptosis in follicular epithelial cells in the rabbit ovary, with special reference to involvement by macrophages. *Arch. Histol. Cytol.*, 58, 257-264.
- Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagai, J., Tanikawa, H., Nakamura, A. & Tanaka, T. 2002. Leptin promotes the development of mouse preimplantation embryos in vitro. *Endocrinology*, 143, 1922-1931.
- Kaynard, A. H., Pau, K. Y. F., Hess, D. L. & Spies, H. G. 1990. Gonadotrophin-Releasing Hormone and Norepinephrine release from the rabbit mediobasal and anterior hypothalamus during the mating-induced luteinizing hormone surge. *Endocrinology*, 127, 1176-1185.
- Keim, N. L., Stern, J. S. & Havel, P. J. 1998. Relation between circulating leptin concentrations and appetite during a prolonged, moderate energy deficit in women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 68, 794-801.
- Kennedy, K. L., Floyd, A. A., Clarkson, A. M. & Lee, V. H. 2003. Epidermal growth factor regulation of connexin 43 in cultured granulosa cells from preantral rabbit follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, 64, 61-69.
- Kermabon, A. Y., Belair, L., Theau-Clement, M., Salesse, R. & Djiane, J. 1994. Effects of anoestrus and bromocryptine treatment on the expression of prolactin and LH receptors in the rabbit ovary during lactation. *J. Reprod. Fertil.*, 102, 131-138.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26, 239-257.
- Kidder, G. M. & Mhawi, A. A. 2002. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, 123, 613-620.
- Kille, J. W. & Hamner, C. E. 1973. The influence of oviducal fluid on the development of one-cell rabbit embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 35, 415-423.
- Kim, H. S., Lee, G. S., Kim, J. H., Kang, S. K., Lee, B. C. & Hwang, W. S. 2006. Expression of leptin ligand and receptor and effect of exogenous leptin supplement on in vitro development of porcine embryos. *Theriogenology*, 65, 831-844.
- Kim, J. M., Boone, D. L., Auyeung, A. & Tsang, B. K. 1998. Granulosa cell apoptosis induced at the penultimate stage of follicular development is associated with increased levels of Fas and Fas Ligand in the rat ovary. *Biol. Reprod.*, 58, 1170-1176.
- Kim, N. H., Day, B. N., Lee, H. T. & Chung, K. S. 1996. Microfilament assembly and cortical granule distribution during maturation, parthenogenetic activation and fertilisation in the porcine oocyte. *Zygote*, 2.
- Kranzfelder, D., Korr, H., Mestwerdt, W. & Maurer-Schulze, B. 1984. Follicle growth in the ovary of the rabbit after ovulation-inducing application of human chorionic gonadotropin. *Cell Tissue Res.*, 238, 611-620.
- Kruip, T. A. & Dieleman, S. J. 1982. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. *Reprod. Nutr. Dev.*, 22, 465-473.
- Kun, Z., Shaohua, W., Yufang, M., Yankun, L., Hengxi, W., Xiuzhu, S., Yonghui, Z., Yan, L., Yunping, D., Lei, Z. & Ning, L. 2007. Effects of leptin supplementation in in vitro maturation medium on meiotic maturation of oocytes and preimplantation development of parthenogenetic and cloned embryos in pigs. *Anim. Reprod. Sci.*, 101, 85-96.
- Kupersmith, D. 1998. A practical overview of small mammal nutrition. *Seminars in avian and Exotic Pet Medicine*, 7.
- Lamb, I. C., G., P. G., Fuller, M. F., Allan, S. J. & Pennie, K. 1984. The effects of different re-mating intervals and diet nutrient density on the performance and body composition changes of the lactating rabbit. *Proc. 3rd World Rabbit Congress, Rome.*, 1, 438-443.
- Lamb, I. C., Strachan, W., Henderson, G., Atkinson, T., Lawson, W., Partridge, G. G., Fuller, M. F. &

- Racey, P. A. 1991. Effects of reducing the remating interval after parturition on the fertility and plasma concentrations of luteinizing hormone, prolactin, oestradiol-17B and progesterone in lactating domestic rabbits. *J. Reprod. Fert.*, 92, 281-289.
- Lebas, F., Coudent, P., de Rochambeau, H. & Thebault, R. 1996. *El conejo cría y patología.*, Roma.
- Lee, E. S., Fukui, Y., Lee, B. C., Lim, J. M. & Hwang, W. S. 2004. Promoting effects of amino acids added to a chemically defined medium on blastocysts formation and blastomere proliferation of bovine oocytes cultured in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, 84, 257-267.
- Lee, G., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I. & Friedman, J. M. 1996. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 379, 632-635.
- Lefèvre, B. & Caillol, M. 1978. Relationship of oestrus behaviour with follicular growth and sex steroid concentration in the follicular fluid in the domestic rabbit. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18, 1435-1441.
- Leibfried-Rutledge, M. L. 1999. Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology*, 51, 473-485.
- Leroy, J. L. M. R., Opsomer, G., Van Soom, A., Goovaerts, I. G. F. & Bols, P. E. J. 2008. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod. Dom. Anim.*, 43, 612-622.
- Leroy, J. L. M. R., Vanholder, T., Mateusen, B., Christophe, A., Opsomer, G., Kruif, A., Genicot, G. & Van Soom, A. 2005. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction*, 130, 485-495.
- Levy, D. E. & Lee, C. K. 2002. What does Stat3 do? *J. Clin. Invest.*, 109, 1143-1148.
- Liang, C. G., Su, Y. Q., Fan, H. Y., Schatten, H. & Sun, Q. Y. 2007. Mechanisms regulating oocyte meiotic resumption: roles of mitogen activated protein kinase. *Molecular Endocrinology*, 21, 2037-2055.
- Lieberman, M. E., Tsafirri, A., Bauminger, S., Collins, W. P., Ahrén, K. & Lindner, H. R. 1976. Oocytic meiosis in cultured rat follicles during inhibition of steroidogenesis. *Acta Endocrinol.*, 83, 151-157.
- Lonergan, P., Carolan, C., Van Langendonck, A., Donnay, I., Khatir, H. & Mermillod, P. 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol. Reprod.*, 54, 1420-1429.
- Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D. & Evans, A. C. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 65, 137-152.
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutiérrez-Adán, A., Fair, T. & Boland, M. P. 2003a. Effect of culture environment on embryo quality and gene expression - experience from animal studies. *Reprod. Biomed. Online*, 7, 657-663.
- Lonergan, P., Rizos, D., Kanka, J., Nemcova, L., Mbaye, A. M., Kingston, M., Wade, M., Duffy, P. & Boland, M. P. 2003b. Temporal sensitivity of bovine embryos to culture environment after fertilization and the implications for blastocyst quality. *Reproduction*, 126, 337-346.
- Longo, F. J. 1974. Ultrastructural Changes in rabbit eggs aged in vitro. *Biol. Reprod.*, 11, 22-39.
- Lorenzo, P. L., Illera, J. C., Silvan, G., Munro, C., J., Illera, M. J. & Illera, M. 1997. Steroid-level response to insulin-like growth factor-1 in oocytes matured in vitro. *J. Reprod. Immunol.*, 35, 11-29.
- Lorenzo, P. L., Illera, M. J., Illera, J. C. & Illera, M. 1994. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J. Reprod. Fert.*, 101, 697-701.
- Lorenzo, P. L., Rebollar, P., Illera, M. J., Illera, J. C., , I., M. & Alvario, J. M. 1996a. Stimulatory effect of insulin-like growth factor I and epidermal growth factor on the maturation of rabbit oocytes in vitro. *J. Reprod. Fert.*, 107, 109-107.
- Lorenzo, P. L., Rebollar, P. G., Illera, M. J., Illera, J. C., Illera, M. & Alvario, J. M. R. 1996b. Characterization of rabbit follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Arch. Zootec.*, 45, 25-35.
- Lu, Q., Rodney, L. D., Rowena, A. & Smith, G. D. 2002. Regulation of Spindle Formation by Active Mitogen-Activated Protein Kinase and Protein Phosphatase 2A During Mouse Oocyte Meiosis. *Biol. Reprod.*, 66, 29-37.
- Lucidi, P., Bernabò, N., Turriani, M., Barboni, B. & Mattioli, M. 2003. Cumulus cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 1, 1-9.
- Lucy, M. C. 2007. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. *Soc. Reprod. Fert. Suppl.*, 64, 237-254.
- Lukaski, H. C., Bolochuk, W. W., Hall, C. B. & Siders, W. A. 1985. Validation of tetrapolar bioelectrical impedance method to assess human body composition. *Journal of Applied Physiology*, 60, 1327-1332.
- Macchiarelli, G., Viza, E., Nottola, S. A., Familiari, G. & Motta, P. M. 1992. Cellular and microvascular

- changes of the ovarian follicle during folliculogenesis; a scanning electro microscopic study. *Arch. Citol. Histol.*, 55, 191-204.
- Maertens, L. 1998. Effect of flushing, mother-litter separation and PMSG on the fertility of lactating does and the performance of their litter. *World Rabbit Science*, 6, 185-190.
- Maillet, G., Benhaïm, A., Mittre, H. & C., F. 2003. Involvement of theca cells and steroids in the regulation of granulosa cell apoptosis in rabbit preovulatory follicles. *Reproduction*, 125, 709-716.
- Maillet, G., Bréard, E., Benhaïm, A., Leymarie, P. & Féral, C. 2002. Hormonal regulation of apoptosis in rabbit granulosa cells in vitro: evaluation by flow cytometric detection of plasma membrane phosphatidylserine externalization. *Reproduction*, 123, 243-251.
- Maller, J. L. & Krebs, E. G. 1980. Regulation of oocyte maturation. *Curr. Top. Cell. Regul.*, 16, 271-311.
- Mansour, L., Pereira, F. G., Araujo, E. P., Amaral, M. E. C., Morari, J., Ferraroni, N. R., Ferreira, D. S., Lorand-Metze, I. & Velloso, L. A. 2006. Leptin Inhibits Apoptosis in Thymus through a Janus Kinase-2-Independent, Insulin Receptor Substrate-1/Phosphatidylinositol-3 Kinase-Dependent Pathway. *Endocrinology*, 147, 5470-5479.
- Mantovani, R., Enright, W. J., Keane, M. G., Roche, J. F. & Boland, M. P. 1993. Effect of nutrition and dose of follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. *Proc. AETE 9th Scientific meeting*, 234.
- Mariana, J. C., Hulot, F., Drevin, C., Tomassone, R. & Poujardieu, B. 1989. Estimation de la durée moyenne de croissance d'un follicule d'ovaire de lapine agée de 20 semaines, dans deux souches. *Archiv. Biol.*, 100, 47-63.
- Matikainen, T., Perez, G., Zheng, T. S., Kluzak, T. R., R., B.R., Flavell, R. A. & Tilly, J. L. 2001. Caspase-3 gene knockout defines cell lineage specificity for programmed cell death signaling in the ovary. *Endocrinology*, 142, 2468-2480.
- McEvoy, T. G., Robinson, J. J. & Sinclair, K. D. 2001. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. *Reproduction*, 22, 507-518.
- McEvoy, T. G., Sinclair, K. D., Staines, M. E., Robinson, J. J., Armstrong, D. G. & Webb, R. 1997. In vitro blastocyst production in relation to energy and protein intake prior to oocyte collection. *J. Reprod. Cadem. Abstr. Ser.*, 19, 132.
- McNatty, K. P. 1978. Cyclic changes in antral fluid hormone concentrations in humans. *Clin. Endocrinol. Metab.*, 7, 577-600.
- McNatty, K. P., Hudson, N. L., Henderson, K. M., Lun, S., Heath, D. A., Gibb, M., Ball, K., McDiarmid, J. M. & Thurley, D. C. 1984. Changes in gonadotrophin secretion and ovarian antral follicular activity in seasonally breeding sheep throughout the year. *J. Reprod. Fertil.*, 70, 309-321.
- McNatty, K. P., Sawers, R. S. & McNeilly, A. S. 1974. A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human Graafian follicle. *Nature*, 250, 653-655.
- McNatty, K. P., Smith, D. M., Makris, A., Osathanondh, R. & Ryan, K. J. 1979. The Microenvironment of the Human Antral Follicle: Interrelationships among the Steroid Levels in Antral Fluid, the Population of Granulosa Cells, and the Status of the Oocyte in Vivo and in Vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 49, 851-860.
- McNeilly, A. S., Glasier, A., Jonassen, J. & Howie, P. W. 1982. Evidence for direct inhibition of ovarian function by prolactin. *Journal of Reproduction and Fertility*, 65, 559-569.
- Melillo, A. 2007. Rabbit clinical pathology. *Journal of exotic pet medicine*, 16, 135-145.
- Mermillod, P., Oussaid, B. & Cognié, Y. 1999. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of the embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 54, 449-460.
- Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Assoc. Chem. Int.*, 85, 1217-1240.
- Mills, T. M. & Gerardot, R. J. 1984. Dissociation of copulation from ovulation in pregnant rabbits. *Biol. Reprod.*, 30, 1243-1252.
- Mingoti, G. Z., Garcia, J. M. & Rosa-e-Silva, A. A. M. 2002. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus-oocyte-complexes matured in vitro with BSA and different concentrations of steroids. *Animal Reproduction Science*, 69, 175-186.
- Mingotti, G. Z., García, J. M. & Rosa-e-Silva, A. A. M. 1995. The effect of serum on in vitro maturation, in vitro fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. *Braz. J. Med. Res.*, 28, 213-217.
- Molina, I., Pla, M. & García, F. 1986. Poblaciones de folículos antrales en función del comportamiento de monta en conejas: utilización de un método simple para la medición de folículos. *ITEA*, 66, 21-26.
- Moor, R. M. 1988. Regulation of the meiotic cycle in oocytes of domestic mammals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 541, 248-258.
- Moschos, S., Chan, J. L. & Mantzoros, C. S. 2002. Leptin and reproduction: a review. *Fertility and sterility*,

- 77, 433-444.
- Motlik, J., Fulka, J. J., Procházka, R., R., Z., Kubelka, M. & F., J. 1989. RNA and protein synthesis requirements for the resumption of meiosis in rabbit oocytes: the role of cumulus cells. *Reprod. Nutr. Dev.*, 29, 601-609.
- Moudgal, N. R., Shetty, G., Selvaraj, N. & Bhatnagar, A. S. 1996. Use of a specific aromatase inhibitor for determining whether there is a role for oestrogen in follicle/oocyte maturation, ovulation and preimplantation embryo development. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 50, 69-81.
- Murakami, H. & Imai, H. 1996. Successful Implantation of In Vitro Cultured Rabbit Embryos After uterine Transfer: A Role for Mucin. *Molecular Reproduction And Development*, 43, 167-170.
- Muñoz-Gutierrez, M., Findlay, P. A., Adam, C. L., W., G., Campbell, B. K., K., N.R., Khalid, M., Forsberg, M. & Scaramuzzi, R. J. 2005. The ovarian expresión of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF binding protein-2, -4 and -5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. *Reproduction*, 130, 869-881.
- Naess, O. 1981. Characterization of cytoplasmic progesterone receptors in rat granulosa cells. Evidence for nuclear translocation. *Acta Endocrinol.*, 98, 288-294.
- Nakamura, H., Kimura, T., Koyama, S., Ogita, k., Tsutsui, T., Shimoyama, K., Taniguchi, T., Koyama, M., Kaneda, Y. & Murata, Y. 2006. Mouse model of human infertility: Transient and local inhibition of endometrial STAT-3 activation results in implantation failure. *FEBS Letters*, 580, 2717-2722.
- Nicodemus, N., Carabaño, R., Gracia, J., Méndez, J. & D. B., C. 1999. Performance response of lactating and growing rabbits to dietary lignin content. *Anim. Feed. Sci. Technol.*, 80, 43-54.
- Nicodemus, N., García, J., Carabaño, R. & De Blas, J. C. 2007. Effect of substitution of a soybean hull and grape seed meal mixture for traditional fiber sources on digestion and performance of growing rabbits and lactating does. *J. Anim. Sci.*, 85, 181-187.
- Nicosia, S. V. & Mikhail, G. 1975. Cumulus oophori in tissue culture: hormone production, ultrastructure, and morphometry of early luteinization. *Fertil. Steril.*, 26, 427-448.
- Nishida, E. & Gotoh, Y. 1993. The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.*, 18, 128-131.
- Nizza, A., Dimeo, C. & Esposito, L. 1997. Influence of the diet used before and after the first mating on reproductive performance of rabbit does. *World Rabbit Science*, 5, 107-110.
- O'Callaghan, D., Yaakub, H., Hyttel, P., Spicer, L. J. & Boland, M. P. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fertil.*, 118, 303-313.
- Overstreet, J. W. & Bedford, J. M. 1974. Comparison of the penetrability of the egg vestments in follicular oocytes, unfertilized and fertilized ova of the rabbit. *Dev. Biol.*, 41, 185-192.
- Overstrom, E. W. 1996. In vitro assessment of embryo viability. *Theriogenology*, 45, 3-16.
- Overstrom, E. W., Benos, D. J. & Biggers, J. D. 1989. Synthesis of Na⁺/K⁺ ATPase by the preimplantation rabbit blastocyst. *J. Reprod. Fertil.*, 85, 283-295.
- Palumbo, A. & Yeh, J. 1994. In situ localization of apoptosis in the rat ovary during follicular atresia. *Biol. Reprod.*, 51, 888-895.
- Parigi Bini, R., Xiccato, G. & Cinetto, M. 1990. Energy and protein retention and partition in rabbit does during first pregnancy. *Cuni-Sci.*, 6, 19-29.
- Parigi Bini, R., Xiccato, G., Dalle Zotte, A., Carazzolo, A., Castellini, C. & Stradaoli, G. 1996. Effect of remating interval and diet on the performance and energy balance of rabbit does. *Proc. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France.*, 1, 253-258.
- Parigi-Bini, R., Xiccato, G., Cinetto, M. & Dalle-zotte, A. 1992. Energy and protein utilization and partition in rabbit does concurrently pregnant and lactating. *Anim. Prod.*, 55, 153-162.
- Park, O. K. & Mayo, K. E. 1991. Transient expression of progesterone receptor messenger RNA in ovarian granulosa cells after the preovulatory luteinizing hormone surge. *Mol. Endocrinol.*, 5, 967-978.
- Partridge, G. G., Daniels, Y. & Fordyce, R. A. 1986. The effects of energy intake during pregnancy in doe rabbits on pup birth weight, milk output and maternal body composition change in the ensuing lactation. *Journal of Agricultural Science*, 107, 697-708.
- Pascual, J. J., Blanco, J., Piquer, O., Quevedo, F. & Cervera, C. 2004. Ultrasound measurement of perineal fat thickness to estimate body condition of reproducing rabbit does at different physiological status. *World Rabbit Science*, 12, 7-21.
- Pascual, J. J., Cervera, C., Blas, E. & Fernández-Carmona, J. 1998. Effect of the high fat diets on the performance and food intake of primiparous and multiparous rabbit does. *Anim. Sci.*, 66, 491-499.
- Pascual, J. J., Cervera, C., Blas, E. & Fernández-Carmona, J. 2003. High-energy diets for reproductive rabbit does: effect of energy source. *Nutrition Abstracts and Reviews. Series B: Livestock Feed and Feeding*, 73, 27-39.

- Pascual, J. J., Cervera, C. & Fernández-Carmona, J. 2000. Effect of fat addition to diet on the performance and body composition in the second lactation of rabbit does. *Animal Feed Science and Technology*, 86, 191-203.
- Pascual, J. J., Cervera, C. & Fernández-Carmona, J. 2002a. A feeding program for young rabbit does based on lucerne diets. *World Rabbit Science*, 10, 7-13.
- Pascual, J. J., Motta, W., Cervera, C., Quevedo, F., Blas, E. & Fernández-Carmona, J. 2002b. Effect of dietary energy source on the performance and perirenal fat thickness evolution of primiparous rabbit does. *Anim. Sci.*, 75, 267-279.
- Pau, C. Y., Pau, K. Y., Berria, M. & Spies, H. 2000. Ovarian influence on gonadotropin and prolactin release in mated rabbits. *Endocrine*, 13, 25-35.
- Pau, K. Y. & Spies, H. G. 1986. Estrogen-dependent effects of norepinephrine on hypothalamic Gonadotropin-releasing Hormone release in rabbit. *Brain. Res.*, 399, 15-23.
- Paula-Lopes, F. F., Boelhauve, M., Habermann, F. A., Sinowatz, F. & Wolf, E. 2007. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms. *Biol. Reprod.*, 8, 532-541.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.*, 22, 153-183.
- Peitsch, M. C., Müller, C. & Tschopp, J. 1993. DNA fragmentation during apoptosis is caused by frequent single-strand cuts. *Nucleic Acids Res.*, 21, 4206-4209.
- Peluso, J. J., Fernandez, G., Pappalardo, A. & White, B. A. 2001. Characterization of a Putative Membrane Receptor for Progesterone in Rat Granulosa Cells. *Biol. Reprod.*, 65, 94-101.
- Pereda, N., Rebollar, P. G., Schwarz, B. F., Arias-Alvarez, M., Revuelta, L., Lorenzo, P. L. & Nicodemus, N. 2007. Estudio de la composición corporal de conejas reproductoras mediante la técnica de Impedancia Bioeléctrica (BIA). Parte II: Ecuaciones de Predicción. *II Congreso Ibérico de Cunicultura, Vila Real, Portugal*, 17-20.
- Peter, M., Sanghera, J. S., Pelech, S. L. & Nigg, E. A. 1992. Mitogen-activated protein kinases phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p34cdc2. *Eur. J. Biochem.*, 205, 287-294.
- Peters, H., Levy, E. & Crone, M. 1965. Oogenesis in rabbit. *J. Exp. Zool.*, 158, 169-180.
- Phillips, K. P., Petrunewich, M. A. F., Collins, J. L. & Baltz, J. M. 2002. The Intracellular pH-regulatory HCO₃⁻/Cl⁻ Exchanger in the Mouse Oocyte Is Inactivated during First Meiotic Metaphase and Reactivated after Egg Activation via the MAP Kinase Pathway. *Mol. Biol. Cell*, 13, 3800-3810.
- Pincus, G. & Enzmann, E. V. 1935. The growth, maturation and atresia of ovarian eggs in the rabbit. *J. Physiol.*, 61, 351-382.
- Plachot, M. & Crozet, N. 1992. Fertilization abnormalities in human in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 7, 89-94.
- Posada, J. & Cooper, J. A. 1992. Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science*, 255, 212-215.
- Pérez, J. M., Lebas, F., Gidenne, T., Maertens, L., Xiccato, G., Parigi-Bini, R., Dalle Zotte, A., Cossu, M. E., Carazzolo, A., Villamide, M. J., Carabaño, R., Fraga, M. J., Ramos, M. A., Cervera, C., Blas, E., Fernández, J., Falcao, E., Cunha, L. & Bengala Freire, J. 1995. European reference method for in vitro determination of diet digestibility in rabbits. *World Rabbit Sci.*, 3, 41-43.
- Pérez-Cabal, M. A. & Alenda, R. 2003. Lifetime profit as an individual trait and prediction of its breeding values in Spanish Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 86, 4115-4121.
- Ramón, J., Rabel, O. & Piles, M. 2004. Resultados de gestión en España GTE 2002. *XXIX Symposium de cunicultura. ASESCU. Lugo (España)*. 29-32.
- Rebollar, P. G. 1993. Inseminación artificial. *Control de la reproducción en cunicultura*, Madrid.
- Rebollar, P. G. 1999. *El aparato reproductor de la coneja y su ciclo hormonal. Sincronización y bioestimulación*, Jornadas Profesionales de Cunicultura de la Real Escuela de Avicultura, Sitges (España).
- Rebollar, P. G., Bonanno, A., Di Grigoli, A., T., G. & Lorenzo, P. L. 2008a. Endocrine and ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit does. *Anim. Reprod. Sci.*, 104, 316-328.
- Rebollar, P. G., Bonanno, A., Di Grigoli, A., Tornambè, G. & Lorenzo, P. L. 2008b. Endocrine and ovarian response after a 2-day controlled suckling and eCG treatment in lactating rabbit does. *Animal Reproduction Science*, 104, 316-328.
- Rebollar, P. G., Espinosa, A., Lorenzo, P. L. & Carabaño, R. 2004. Transitory disturbances in growing lactating rabbits after transient doe-litter separation. *Reprod. Nutr. Dev.*, 44, 437-447.
- Rebollar, P. G., Lorenzo, P. L., Carneiro, G. F. & Liu, I. K. M. 2001. Estudios preliminares sobre la

- migración de gránulos corticales in oocitos de conejas sometidas a distintos métodos de sincronización de celo. ITEA, 2.
- Rebollar, P. G., Milanés, A., Pereda, N., Millán, P., Cano, P., E., A.I., Villarroel, M., S., G. & Lorenzo, P. L. 2006a. Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe-litter separation or eCG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles. *Animal Reproduction Science*, 93, 218-230.
- Rebollar, P. G., Milanés, A., Pereda, N., Millán, P., Cano, P., Esquifino, A. I., Villarroel, M., Silván, G. & Lorenzo, P. L. 2006b. Oestrus synchronisation of rabbit does at early post-partum by doe-litter separation or ECG injection: Reproductive parameters and endocrine profiles. *Animal Reproduction Science*, 93, 210-230.
- Rebollar, P. G., Millán, P., Schwarz, B. F., Pereda, N., Marco, M., Lorenzo, P. L. & Nicodemus, N. 2008c. Young rabbit does fed with fibrous diet during rearing: serical and productive parameters. *9th World Rabbit Congress Verona, Italia*, 1, 431-435.
- Rebollar, P. G., Pereda, N., Villarroel, M., Millán, P. & Lorenzo, P. L. 2006c. Oestrus synchronization of rabbit does at early post-partum by dam-litter separation or eCG injection: effect on kit mortality and growth. *Livestock Science*, 103, 13-22.
- Rebollar, P. G., Pérez-Cabal, M. A., Pereda, N., Lorenzo, P. L., Arias-Álvarez, M. & García-Rebollar, P. 2009. Effects of parity order and reproductive management on the efficiency of rabbit productive systems. *Livestock Science*, 121, 227- 233.
- Rebollar, P. G., Ubilla, E., Alvaríño, J. C., Illera, J. C. & Silván, G. 1992a. Influencia del nivel de receptividad sexual sobre el estradiol plasmático y la respuesta ovulatoria durante el postparto en la coneja. *Rev. Esp. Fisiol.*, 48, 13-18.
- Rebollar, P. G., Ubilla, E., Alvaríño, J. M., Illera, J. C. & Silván, G. 1992b. Effect of the level of sexual receptivity on plasma oestradiol and the ovulatory response during the postpartum period in the rabbit. *Revista Española de Fisiología*, 48, 13-7.
- Rebollar, P. G., Ubilla, E., Lorenzo, P. L., Sánchez-Dávila, M., Sánchez, J., Tucker, L. & J.M.R., A. 2000. Ovulation and embryo implantation rate in synchronized artificial inseminated multiparous lactating does. *Journal of the World rabbit Science Association*, 1.
- Reed, M. J. & James, V. H. T. 1989. Regulation of steroid synthesis and metabolism by growth factors. *Clin. Endocrinol.*, 31, 511-525.
- Reynaud, k., Nogueira, D., Cortvridt, R., Kurzawa, R. & Smitz, J. 2001. Confocal microscopy: principles and applications to the field of reproductive biology. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 39, 75-85.
- Rizos, D., Kenny, D. A., Griffin, W., Quinn, K. M., Duffy, P., Mulligan, F. J., Roche, J. F., Boland, M. P. & L., P. 2008. The effect of feeding propylene glycol to dairy cows during the early postpartum period on follicular dynamics and on metabolic parameters related to fertility. *Theriogenology*, 69, 688-699.
- Rizos, D., Ward, F., Duffy, P., Boland, M. P. & Lonergan, P. 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 234-248.
- Rodríguez, J. M., Agrasal, C. & Esquifino, A. 1989. Influence of sexual receptivity on LH, FSH and prolactin release after GnRH administration in female rabbits. *Anim. Reprod. Sci.*, 20, 57-65.
- Rommers, J. M. 2004. Breeding of young females does. *8th World Rabbit Congress. Puebla, México*, 1518-1531.
- Rommers, J. M., Meijerhof, R., N., J.P.T.M. & Kemp, B. 2004. Effect of feeding program during rearing and age at first insemination on performances during subsequent reproduction in young rabbit does. *Reprod. Nutr. Dev.*, 44, 321-332.
- Rommers, J. M., Meijerhof, R., Noordhuizen, J. P. T. M. & K., B. 2002. Relationships between body weight at first mating and subsequent body development, feed intake, and reproductive performance of rabbit does. *J. Anim. Sci.*, 80, 2036-2042.
- Rommers, J. M., R., M. & Noordhuizen, J. P. T. M. 2001. Effect of different feeding levels during rearing and age at first insemination on body development, body composition, and puberty characteristics of rabbit does. *World Rabbit Science*, 9, 101-108.
- Roy, S. K. & Greenwald, G. S. 1988. In vitro effects of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and prolactin on follicular deoxyribonucleic acid synthesis in the hamster. *Endocrinology*, 122, 952-958.
- Ruiz-Cortés, Z. T., Martel-Kennes, Y., Gévry, N. Y., Downey, B. R., Palin, M. F. & Murphy, B. D. 2003. Biphasic effects of leptin in porcine granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 68, 789-796.
- Runner, M. N. & Gates, A. 1954. Conception in prepuberal mice following artificially induced ovulation and mating. *Nature*, 174, 222-223.

- Ryan, N. K., Van der Hoek, K. H., Robertson, S. A. & Norman, R. J. 2003. Leptin and leptin receptor expression in the rat ovary. *Endocrinology*, 144, 5006-5013.
- Ryan, N. K., Woodhouse, C. M., Van der Hoek, K. H., Gilchrist, R. B., Armstrong, D. T. & Norman, R. J. 2002a. Expression of Leptin and Its Receptor in the Murine Ovary: Possible Role in the Regulation of Oocyte Maturation. *Biol. Reprod.*, 66, 1548-1554.
- Ryan, N. K., Woodhouse, C. M., Van der Hoek, K. H., Gilchrist, R. B., Armstrong, D. T. & Norman, R. J. 2002b. Expression of Leptin and Its Receptor in the Murine Ovary: Possible Role in the Regulation of Oocyte Maturation. *Biol. Reprod.*, 66, 1548-1554.
- Salveti, P., Theau-Clément, M., Beckers, J. F., Hurtaud, J., Guérin, P., Neto, V., Falières, J. & Joly, T. 2007. Effect of luteinizing hormone on embryo production in superovulated rabbit does. *Theriogenology*, 67, 1185-1193.
- Sartori, R., Haughian, J. M., Shaver, R. D., Rosa, G. J. & Wiltbank, M. C. 2004. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 87, 905-920.
- Saxena, N. K., Vertino, P. M., Anania, F. A. & Sharma, D. 2007. Leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to cyclin D1 promoter via activation of stat3. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 13316-13325.
- Scaramuzzi, R. J., Adams, N. R., Baird, D. T., Campbell, B. K., Downing, J. A., Findlay, J. K., Henderson, K. M., Martin, G. B., McNatty, K. P., McNeilly, A. S. & Tsonis, C. G. 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod. Fertil. Dev.*, 5, 459-478.
- Schreiber, J. R., Nakamura, K. & Erickson, G. F. 1980. Progestins inhibit FSH-stimulated steroidogenesis in cultured rat granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 19, 165-173.
- Schulz, B. O., Diedrich, K. K., Knöll, H., Höbell, K. & Hamerich, U. 1985. Effects of granulosa cells and gonadotrophins on maturation of rabbit oocytes in vitro. *Arch. Gynecol.*, 236, 135-143.
- Seeger, R. & Krebs, E. G. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*, 9, 726-735.
- Seidel, G. E., Bowen, R. A. & Kane, M. T. 1976. In vitro fertilization, culture, and transfer of rabbit ova. *Fertil. Steril.*, 27, 861-870.
- Sharma, D., Saxena, N. K., Vertino, P. M. & Anania, F. A. 2006. Leptin promotes the proliferative response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signal-transduction pathways. *Endocrine-Related Cancer*, 13, 629-640.
- Shibuya, E. K., , B., T.G., Cobb, M. H. & Ruderman, J. V. 1992. Activation of p42 MAP kinase and the release of oocytes from cell cycle arrest. *EMBO J.*, 11, 3963-3975.
- Shirazi, A. & Moalemian, Z. 2007. Ovine cumulus cells estradiol-17 β production in the presence or absence of oocyte. *Anim. Reprod. Sci.*, 101, 125-133.
- Siddiqui, M. A., Shamsuddin, M., Bhuiyan, M. M., Akbar, M. A. & Kamaruddin, K. M. 2002. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. *Reprod. Domest. Anim.*, 37, 37-41.
- Silva, C. C. & , K., P.G. 2000. Effects of androgens, progesterone and their antagonists on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, 119, 261-269.
- Sirard, M. A. 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, 55, 1241-1254.
- Sirard, M. A., Picard, L., Dery, M., Coenen, K. & Blondin, P. 1999. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. *Theriogenology*, 51, 699-708.
- Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P. & Robert, C. 2006. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65, 126-136.
- Sirotkin, A. V. 1992. Involvement of steroid hormones in bovine oocyte maturation in vitro. *J. Steroid Biochem.*, 41, 855-858.
- Sirotkin, A. V. & Grossmann, R. 2007. Leptin directly controls proliferation, apoptosis and secretory activity of cultured chicken ovarian cells. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 148, 422-429.
- Sirotkin, A. V., Mlynček, M., Kotwica, J., Makarevich, A. V., Florkovicová, I. & Hetényi, L. 2005. Leptin directly controls secretory activity of human ovarian granulosa cells: possible inter-relationship with the IGF/IGFBP system. *Horm. Res.*, 64, 198-202.
- Snijders, S. E. M., Dillon, P., O'Callaghan, D. O. & Boland, P. 2000. Effect of genetic merit, milk yield, body conditions and lactation number of in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology*, 53, 981-989.
- Stephane, B. & Bernard, M. 2005. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space. *Reproduction*, 130, 801-811.
- Steven, F., Palter, A. B., Tavares, A. H., , J., D.V. & Adashi, E. Y. 2001. Are Estrogens of Import to Primate/Human Ovarian Folliculogenesis?. *Endocr. Rev.*, 22, 389-424.

- Stoufflet, I. & Caillol, M. 1988. Relation between circulating sex steroid concentrations and sexual behaviour during pregnancy and post partum in the domestic rabbit. *J. Reprod. Fertil.*, 82, 209-218.
- Su, Y. Q., Nyegaard, M., Overgaard, M. T., Qiao, J. & Giudice, L. C. 2006. Participation of mitogen-activated protein kinase in luteinizing hormone-induced differential regulation of steroidogenesis and steroidogenic gene expression in mural and cumulus granulosa cells of mouse preovulatory follicles. *Biol. Reprod.*, 75, 859-867.
- Sun, F. Z. & Moor, R. M. 1991. Nuclear-cytoplasmic interactions during ovine oocyte maturation. *Development*, 111, 171-180.
- Sun, Q. Y., Lai, L., Park, K., Kühholzer, B., Prather, R. S. & Schatten, H. 2001. Dynamic Events Are Differently Mediated by Microfilaments, Microtubules, and Mitogen-Activated Protein Kinase During Porcine Oocyte Maturation and Fertilization In Vitro. *Biol. Reprod.*, 64, 879-889.
- Sun, Q. Y., Lu, Q., Breitbart, H. & Chen, D. Y. 1999. CAMP inhibits mitogen-activated protein (MAP) kinase activation and resumption of meiosis, but exerts no effects after spontaneous germinal vesicle breakdown (GVBD) in mouse oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 11, 81-86.
- Sun, Q. Y. & Schatten, H. 2006. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*, 131, 193-205.
- Sun, Q. Y., Wu, G., Lai, L., Bonk, A., Cabot, R., Park, K., Day, B. N., Prather, R. S. & Schatten, H. 2002. Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphorylation, Microtubule Organization, Chromatin Behavior, and Cell Cycle Progression by Protein Phosphatases During Pig Oocyte Maturation and Fertilization In Vitro. *Biol. Reprod.*, 66, 580-588.
- Sun, S. C., Xiong, B., Lu, S. S. & Sun, Q. Y. 2008. MEK1/2 is a critical regulator of microtubule assembly and spindle organization during rat oocyte meiotic maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 75, 1542-1548.
- Sutovsky, P., Jelinkova, L., Antalikova, L. & Motlik, J. 1993. Ultrastructural cytochemistry of the nucleus and nucleolus in growing rabbit oocytes. *Biology of the Cell*, 77, 133-180.
- Sutton, M. L., Gilchrist, R. B. & Thompson, J. G. 2003. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human Reproduction Update*, 9, 35-48.
- Suzuki, H., Sasaki, Y., Shimizu, M., Matsuzaki, M., Hashizume, T. & Kuwayama, H. 2009. Ghrelin and Leptin Did Not Improve Meiotic Maturation of Porcine Oocytes Cultured In Vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 9999.
- Suzuki, S., Endo, Y., T., F., Tanaka, S. & Iizuka, R. 1983. Cytochemical study of steroid-producing activities of human oocytes. *Fertil. Steril.*, 39, 683-689.
- Swain, J. E., Dunn, R. L., McConnell, D., Gonzalez-Martinez, J. & Smith, G. D. 2004. Direct Effects of Leptin on Mouse Reproductive Function: Regulation of Follicular, Oocyte, and Embryo Development. *Biol. Reprod.*, 71, 1446-1452.
- Szendrő, Z. S., Horn, P., Köver, G. I., Berényi, E., Radnai, I. & Biro-Nemeth, E. 1992. In vivo measurement of the carcass traits of meat type rabbits by X-ray computerised tomography. *J. Appl. Rabbit Res.*, 15, 799-809.
- Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T. & S., A. 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3801-3804.
- Tartaglia, L. A. 1997. The leptin receptor. *J. Biol. Chem.*, 272, 6093-6096.
- Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Wool, E. A., Monroe, C. A. & Tepper, R. I. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*, 83, 1263-1271.
- Telford, N. A., Watson, A. J. & Schultz, G. A. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol. Reprod. Dev.*, 26, 90-100.
- Tena-Sempere, M. 2007. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. *Neuroendocrinology*, 86, 229-241.
- Tesarik, J. & Mendoza, C. 1997. Direct non- genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. *Hum. Reprod. Update*, 3, 95-100.
- Theau-Clément, M. 2000. Advances in biostimulation methods applied to rabbit reproduction. *7th World Rabbit Congress, Valencia, (España)*.
- Theau-Clément, M. & Lebas, F. 1996. Effect of a systemic eCG treatment 48h before artificial insemination on the productive performance of rabbit does. *World rabbit Science*, 4, 47-56.
- Theau-Clément, M., Poujardieu, B. & Bellereaud, J. 1990. Influence des traitements lumineux, modes de reproduction et états physiologiques sur la productivité de lapines multipares. *5èmes Journ. Rech.*

- Cunicole, Paris, France*, 1, 7.
- Theau-Clément, M. & Roustan, A. 1992. A study on relationships between receptivity and lactation in the doe, and their influence on reproductive performance. *Journal of Applied Rabbit Research*, 15, 412-421.
- Tietz, N. W. 1995. *Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd Edition*. WB Saunders Company, Philadelphia.
- Tilly, J. L., Kowalski, K., Johnson, A. L. & Hsueh, A. J. 1991. Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology*, 129, 2799-2801.
- Tomek, W., Torner, H. & Kanitz, W. 2002. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. *Reprod. Domest. Anim.*, 37, 86-91.
- Tontea, S. A. & Di Zerega, G. S. 1989. Intraovarian regulation of follicular maturation. *Endocrine Rev.*, 10, 205-229.
- Torner, H., Kubelka, M., Heilel, B., Tomek, W., Alm, H., Kuzmina, T. & Guiard, V. 2001. Dynamics of meiosis and protein kinase activities in bovine oocytes correlated to prolactin treatment and follicle size. *Theriogenology*, 55, 885-899.
- Torres, S., Gerard, M. & Thibault, C. 1977. Fertility factors in lactating rabbits mated 24 hours and 25 days after parturition. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 17, 63-69.
- Truchet, S., Chebrou, M., Djedat, C., Wietzerbin, J. & Debey, P. 2004. Presence of permanently activated signal transducers and activators of transcription in nuclear interchromatin granules of unstimulated mouse oocytes and preimplantation embryos. *Biology of Reproduction*, 71, 1330-1339.
- Tsai, E. M., Yang, C. H., Chen, S. C., Liu, Y. H., Chen, H. S., Hsu, S. C. & Lee, J. N. 2002. Leptin Affects Pregnancy Outcome of In Vitro Fertilization and Steroidogenesis of Human Granulosa Cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 19, 169-176.
- Tschöp, M., Smiley, D. L. & Heiman, M. L. 2000. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature*, 407, 908-913.
- Tsutsumi, Y., Takeda, T., Suzuki, H., Iwasaki, Y., Inada, K. & Minawi, T. 1980. Peripheral serum levels of progesterone and prostaglandin F_{2a} during egg transport in superovulated rabbit. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 26, 15-23.
- Ubilla, E. & Rebollar, P. G. 1995. Influence of the postpartum day on plasma estradiol-17b levels, sexual behaviour and conception rate, in artificially inseminated lactating rabbits. *Anim. Reprod. Sci.*, 38, 337-344.
- Ubilla, E., Rebollar, P. G., Pazo, D., Esquifino, A. & Alvarino, J. M. 2000a. Effects of doe litter separation on endocrinological and productivity variables in lactating rabbits. *Livestock Science*, 67, 67-74.
- Ubilla, E., Rebollar, P. G., Pazo, D., Esquifino, A. & Alvarino, J. M. R. 2000b. Pituitary and ovarian response to transient doe-litter separation in nursing rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118, 361-366.
- Ubilla, E., Rebollar, P. G., Pazo, D., Esquifino, A. I. & Alvarino, J. M. 2000c. Pituitary and ovarian response to transient doe-litter separation in nursing rabbits. *J. Reprod. Fertil.*, 118, 361-366.
- Van Blerkom, J. & McGaughey, R. W. 1978. Molecular differentiation of the rabbit ovum I: during oocyte maturation in vivo and in vitro. *Dev. Biol.*, 63, 139-150.
- Van der Hurk, R. & Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63, 1717-1751.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd edn. Cornell Univ. Press, Ithaca, N.Y.
- Van Tol, H. T. A., Van Eerdenburg, F., C., B. & Roelen, B. A. J. 2008. Enhancement of bovine oocyte maturation by leptin is accompanied by an upregulation in mRNA expression of leptin receptor isoforms in cumulus cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 75, 578-587.
- Vanderhyden, B. C. & Macdonald, E. A. 1998. Mouse Oocytes Regulate Granulosa Cell Steroidogenesis Throughout Follicular Development. *Biol. Reprod.*, 59, 1296-1301.
- Vanderhyden, B. C. & Tonary, A. M. 1995. Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by A factor(s) secreted by the oocyte. *Biol. Reprod.*, 53, 1243-1250.
- Vanholder, T., Leroy, J. L. M. R., Van Soom, A., Opsomer, G., Maes, D., Coryn, M. & d. K., A. 2005. Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro. *Animal Reproduction Science*, 87, 33-44.
- Velasco, B., Rebollar, P. G., Marco, M., Costa, R. & García-Rebollar, P. 2008. Resultados productivos de sistemas extensivos y estimación de costes. *XXXIII Symposium de Cunicultura, Calahorra (España)*, 52-55.
- Velasco, B., Rebollar, P. G., Marco, M., Costa, R. & García-Rebollar, P. 2009. Cambios en la productividad anual de una explotación comercial por la intensificación del ritmo reproductivo. *XXXIV*

- Symposium de Cunicultura, Sevilla*, 181-186.
- Veldhuis, J. D., Klase, P. A., Strauss, J. F. & Hammond, J. M. 1982. The role of estradiol as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone: in vitro studies in swine granulosa cells. *Endocrinology*, 111, 144-151.
- Velilla, E., Izquierdo, D., Rodríguez-González, E., López-Béjar, M., Vidal, F. & Paramio, M. T. 2004. Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilisation: ultrastructural and cytochemical study. *Mol. Reprod. Dev.*, 68, 507-514.
- Velázquez, A., Reyes, A., Chargo, J. & Rosado, A. 1977. Amino acid and protein concentrations of human follicular fluid. *Fertil. Steril.*, 28, 96-100.
- Verlhac, M. H., Kúbiak, J. Z., Arlinghaus, R. B., Pines, J. & Maro, B. 1993. MAP kinase becomes stably activated at metaphase and is associated with microtubule organizing centers during meiotic maturation of mouse oocytes. *Dev. Biol.*, 158, 330-340.
- Verlhac, M. H., Kúbiak, J. Z., Clarke, H. J. & Maro, B. 1994. Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development*, 120, 1017-1025.
- Viard Drouet, F., Coudert, P., Durand, P. & Provot, F. 1980. Evolution physiologique ou pathologique de quelques paramètres plasmatiques chez les lapines reproductrices primaires. *2nd World Rabbit Congress, April, Barcelone, Spain.*, 1, 118-127.
- Walters, A. H., Bailey, T. L., Pearson, R. E. & Gwazdauskas, F. C. 2002. Parity-Related changes in bovine follicle and oocyte populations, oocyte quality, and hormones to 90 days postpartum. *Journal of Dairy Science*, 2002, 824-832.
- Wang, H., Isobe, N., Kumamoto, K., Yamashiro, H., Yamashita, Y. & Terada, T. 2006. Studies of the role of steroid hormone in the regulation of oocyte maturation in cattle. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 4, 4.
- Wang, W., Hosoe, M., Li, R. & Shioya, Y. 1997a. Development of the competence of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. *Dev. Growth Differ.*, 39, 607-615.
- Wang, W. H., Sun, Q. Y., Hosoe, M., Shioya, Y. & Day, B. N. 1997b. Quantified analysis of cortical granule distribution and exocytosis of porcine oocytes during meiotic maturation and activation. *Biol. Reprod.*, 56, 1376-1382.
- Wassarman, P. M. 1999. Fertilization in animals. *Dev. Genet.*, 25, 83-86.
- Wen, L., Craig, J., Dyce, P. W. & Li, J. 2006. Cloning of porcine signal transducer and activator of transcription 3 cDNA and its expression in reproductive tissues. *Reproduction*, 132, 511-518.
- Wessel, G. M., Sean D. Conner, S. D. & Berg, L. 2002. Cortical granule translocation is microfilament mediated and linked to meiotic maturation in the sea urchin oocyte. *Development*, 129, 4315-4325.
- Williams, G. L., Amstalden, M., Garcia, M. R., Stanko, R. L., Nizielski, S. E., Morrison, C. D. & Keisler, D. H. 2002. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 23, 339-349.
- Wolgemuth, D. J., Celenza, J., Bundman, D. S. & Dunbar, B. S. 1984. Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Dev. Biol.*, 106, 1-14.
- Xiccato, G. 1996. Nutrition of lactating does. *Proc. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France.*, 29-47.
- Xiccato, G., Bernardini, M., Castellini, C., Dalle Zotte, A., Queaque, P. I. & Trocino, A. 1999. Effect of post-weaning feeding on the performance and energy balance of female rabbits at different physiological states. *J. Anim. Sci.*, 77, 416-426.
- Xiccato, G., Parigi Bini, R., Dalle Zotte, A., Carazzolo, A. & Cossu, M. E. 1995a. Effect of dietary energy level, addition of fat and physiological state on performance and energy balance of lactating and pregnant rabbit does. *Anim. Sci.*, 61, 387-398.
- Xiccato, G., Parigi-Bini, R., Dalle Zotte, A., Carazollo, A. & Cossu, M. E. 1995b. Effect of dietary energy level, addition of fat and physiological state on performance and energy balance of lactating and pregnant rabbit does. *Animal Science*, 61, 387-398.
- Xiccato, G., Trocino, A., Boiti, C. & Brecchia, G. 2005. Reproductive rhythm and litter weaning age as they affect rabbit doe performance and body energy balance. *Animal Science*, 81, 289-296.
- Xiccato, G., Trocino, A., Sartori, A. & Queaque, P. I. 2004. Effect of parity order and litter weaning age on the performance and body energy balance of rabbit does. *Livest. Prod. Sci.*, 85, 239-251.
- Yang, H., F., G.R., P., J.E., J., L.J., Shurson, G. C., Costa, A. N. & Z., L.J. 2000. Impact of dietary lysine intake during lactation on follicular development and oocyte maturation after weaning in primiparous sows. *Journal of Animal Science*, 78.
- Yang, X., Kubota, C., Suzuki, H., Taneja, M., Bols, P. E. & Presicce, G. A. 1998. Control of oocyte maturation in cows biological factors. *Theriogenology*, 49.
- Yoshida, M., Cran, D. G. & Pursel, V. G. 1993. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins

- of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 36, 462-468.
- Yoshimura, Y., Hosoi, Y., Bongiovanni, A. M., Santulli, R., Atlas, S. J. & Wallach, E. E. 1987. Are ovarian steroids required for ovum maturation and fertilization? Effects of cyanoketone on the in vitro perfused rabbit ovary. *Endocrinology*, 120, 2555-2561.
- Yoshimura, Y., Hosoi, Y., Irritan, A., Nakamura, Y., Atlas, S. J. & Wallach, E. E. 1989. Developmental potential of rabbit oocyte matured in vitro: the possible contribution of prolactin. *Biology of Reproduction*, 41, 26-33.
- Yoshimura, Y., Nakamura, Y., Ando, M., Jinno, M., Oda, T., Karube, M., Koyama, N. & Nanno, T. 1992. Stimulatory role of cyclic adenosine monophosphate as a mediator of meiotic resumption in rabbit oocytes. *Endocrinology*, 131, 351-356.
- Young, V. R. 1979. Diet as a modulator of aging and longevity. *Federation Proceedings*. 38, 6.
- Younis, A. I., Brackett, B. G. & Fayrer-Hosken, R. A. 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res.*, 23, 189-201.
- Yu, H. Q., Bou, S., Chen, D. Y. & Sun, Q. Y. 2002. Phosphorylation of MAP kinase and p90rsk and its regulation during in vitro maturation of cumulus-enclosed rabbit oocytes. *Zygote*, 10, 311-316.
- Zachow, R. J. & Magoffin, D. A. 1997. Direct intraovarian effects of leptin: impairment of the synergistic action of insulin-like growth factor-I, on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol 17- β production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 138, 847-850.
- Zachow, R. J., Weitsman, S. R. & Magoffin, D. A. 1999. Leptin Impairs the Synergistic Stimulation by Transforming Growth Factor- β of Follicle-Stimulating Hormone-Dependent Aromatase Activity and Messenger Ribonucleic Acid Expression in Rat Ovarian Granulosa Cells. *Biol. Reprod.*, 61, 1104-1109.
- Zamorano, P. L., Mahesh, V. B., De Sevilla, L. M., Chorch, L. P., Bhat, G. K. & Brann, D. W. 1997. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology*, 65, 223-228.
- Zerani, M., Boiti, C., Dall'Aglio, C., Pascucci, L., Maranesi, M., Brechia, G., Mariottini, C., Guelfi, G., Zampini, D. & A., G. 2005. Leptin receptor expression and invitro leptin actions on prostaglandin release and nitric oxide synthase activity in the rabbit oviduct. *J. Endoc.*, 185, 319-325.
- Zerani, M., Boiti, C., Zampini, D., Brechia, G., Dall'Aglio, C., Ceccarelli, P. & Gobbetti, A. 2004. Ob receptor in rabbit ovary and leptin in vitro regulation of corpora lutea. *Journal of Endocrinology*, 183, 279-288.
- Zhang, K., Wei, H. X., Zhang, Y. H., Wang, S. H., Li, Y., Dai, Y. P. & Li, N. 2007. Effects of ghrelin on in vitro development of porcine in vitro fertilized and parthenogenetic embryos. *J. Reprod. Dev.*, 53, 647-653.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. & Friedman, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.
- Zhilin, L., de Matos, D. G., Fan, H., Shimada, M., Palmer, S. & Richards, J. A. S. 2009. IL6: an autocrine regulator of the mouse cumulus cell-oocyte complex expansion process. *Endocrinology*, en.2008-1532.

ANEXO I

IMÁGENES

Imagen 2.1. Representación esquemática de los principales ritmos reproductivos utilizados en cunicultura, realizando destetes a 25 días post-parto	10
Imagen 2.2. Representación esquemática del desarrollo folicular y la ovulación	18
Imagen 2.3. Representación esquemática de los principales cambios bioquímicos y morfológicos que acontecen durante el proceso de apoptosis	21
Imagen 2.4. Representación esquemática del proceso general de maduración meiótica del oocito de mamífero	24
Imagen 2.5. Imagen de las principales configuraciones nucleares visualizadas con orceína acética a lo largo de la maduración nuclear de la coneja	25
Imagen 2.6. Representación esquemática de la distribución de las organelas durante la maduración del oocito, la fecundación y el estadio de cigoto	26
Imagen 2.7. Representación esquemática de los principales patrones de distribución de los gránulos corticales en el oocito	29
Imagen 2.8. Representación esquemática de los estadios de maduración nuclear en el oocito y de la actividad conjunta del MPF y de las MAPK durante este proceso.	30
Imagen 2.9. Representación esquemática de la fecundación y del desarrollo embrionario preimplantacional hasta el estadio de blastocisto	35
Imagen 2.10. Imagen de un blastocisto de coneja rodeado de la capa de mucina	35
Imagen 2.11. Isoformas corta y larga del receptor de la leptina	44
Imagen 2.12. Representación esquemática de las vías intracelulares de las JAK/ STAT3 y de las MAPK, activadas por la unión de la leptina con su receptor de membrana	45
Imagen 3.1: Nave de maternidad de la granja experimental de la UPM	52
Imagen 3.2. Procedimiento de extracción de semen e inseminación artificial	54
Imagen 3.3. Electrodo colocados en la coneja para la medición de la bioimpedancia eléctrica	55
Imagen 3.4. Aspecto de la coloración de las cubetas con las muestras para el análisis de la absorbancia	56
Imagen 3.5. Aspecto macroscópico de los ovarios de la coneja	58
Imagen 3.6. Categorías foliculares en cortes histológicos de ovario de coneja teñidos con hematoxilina-eosina	59
Imagen 3.7. Recuperación de los complejos cúmulo-oocito (COC). A) Exposición del ovario, oviducto y útero en una laparotomía media-ventral. B, C) Recuperación de los COC mediante aspiración folicular bajo microscopio estereoscópico. D) COC seleccionado para la maduración <i>in vitro</i>	63
Imagen 3.8. Lavado del tracto reproductor	66

Imagen 3.9. Embriones de coneja en distintos estadios rodeados de la capa de mucina	66
Imagen 4.1. Representación esquemática del diseño correspondiente al Experimento 1a, para determinar el estatus ovárico en conejas primíparas lactantes después de la administración de dos tratamientos de sincronización de estro: con eCG (Grupo eCG) o mediante destete transitorio 24 horas (Grupo Bio)	69
Imagen 4.2. Representación esquemática del diseño correspondiente al Experimento 1b, para estudiar la composición corporal, el estatus metabólico y ovárico en conejas primíparas en dos momentos del post-parto que determinan los ritmos reproductivos: semi-intensivo (Grupo S) y extensivo (Grupo E)	117
Imagen 4.3. Representación esquemática del diseño correspondiente al Experimento 2a, para determinar la composición corporal, el estatus metabólico y ovárico en el momento de la primera IA y el desarrollo embrionario preimplantacional en conejas nulíparas alimentadas con piensos fibrosos con un contenido estándar de lignina (Grupo SL) o elevado (Grupo HL) durante la recría	137
Imagen 4.4. Representación esquemática del diseño correspondiente al Experimento 2b, para determinar la composición corporal, el estatus metabólico y ovárico en el momento de la primera IA y el desarrollo embrionario preimplantacional en conejas primíparas alimentadas con piensos fibrosos con un contenido estándar de lignina (Grupo SL) o elevado (Grupo HL) durante la recría	153
Imagen 4.5. Representación esquemática del diseño correspondiente al Experimento 3, para determinar la presencia del receptor de la leptina, el efecto de la leptina sobre la maduración <i>in vitro</i> de los oocitos de coneja y las vías a través de las cuáles actúa la leptina mediante el uso de inhibidores de las MAPK y STAT3	203

TABLAS

Tabla 3.1. Composición química (% MS) de los piensos experimentales fibrosos con un contenido estándar (pienso SL) o elevado (pienso HL) de lignina ácido detergente	50
Tabla 3.2. Composición en ingredientes (%) de los piensos experimentales fibrosos con un contenido estándar (pienso SL) o elevado (pienso HL) de lignina ácido detergente	50
Tabla 3.3. Grupos experimentales diseñados para estudiar el efecto de la leptina a través de la activación de las MAPK y las STAT3, mediante la adición al medio de inhibidores de ambas vías de señalización	52

ANEXO II

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPc: adenosin 3',5'-monofosfato cíclico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATP: adenosin trifosfato

BIA: bioimpedancia eléctrica

BSA: albúmina sérica bovina

COC: complejos cúmulo-oocito

DAB: 3, 3'-diaminobenzidina

DAG: diacilglicerol

dUTPs: nucleótidos marcados

eCG: gonadotropina coriónica equina

EGF: factor de crecimiento epidérmico

ELISA: enzimoimmunoanálisis

ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares

FITC-LCA: fluoresceína isotiocianato conjugada con la lectina LCA (aglutinina de Lens culinaris)

FND: fibra neutro detergente

FSH: hormona folículo estimulante

GC: gránulos corticales

GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas

HCG: gonadotropina coriónica humana

HRP: peroxidasa de rábano

IA: inseminación artificial

i.m.: intramuscular

IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I

IGF/IGFBP: proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina de tipo I

IP3: inositol trifosfato

JAK/ STAT3: factores activadores de transcripción 3 citoplasmáticos dependientes de quinasas janus

LAD: lignina ácido detergente

LH: hormona luteinizante

MAPK: proteínas quinasa activadas por mitógenos

MEKs: proteínas quinasas activadoras de las MAPK

MPF: factor promotor de la meiosis

MS: materia seca

NEFA: ácidos grasos no esterificados

NO: óxido nítrico

Ob-R: receptor de la leptina

Pb: pares de bases

PG_{F2α}: prostaglandina _{F2α}

PBS: tampón fosfato

PI: propidio lodado

PKC: proteína quinasa C

PKC: proteína quinasa C

PRL-R: receptor de la prolactina

RIA: radioinmunoanálisis

TBS: tampón Tris

TCM: medio de cultivo tisular

TdT: enzima deoxinucleotidil transferasa (TdT, Terminal Deoxinucleotidyl Transferasa)

TUNEL: marcaje del ADN en el extremo 3' terminal mediado por la enzima deoxinucleotidil transferasa

UI: unidades internacionales

ANEXO III

PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS RELACIONADAS

Publicaciones

Arias-Alvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Lorenzo PL. Desarrollo Folicular en la Coneja. Información Técnica Económica Agraria (ITEA) 2007, 103: 173-185.

Rebollar PG, Pérez-Cabal MA, Pereda N, Lorenzo PL, **Arias-Alvarez M**, García-Rebollar P. Effects of parity order and reproductive management on the efficiency of rabbit productive systems
Livestock Science 2009, 123; 107-115.

Arias-Alvarez M, Garcia-Garcia RM, Rebollar PG, Nicodemus N, Revuelta L, Millán P, Lorenzo PL. Effects of a lignin- rich fibre diet on productive, reproductive and endocrine parameters in nulliparous rabbit does.
Livestock Science 2009, 121; 227-233.

Garcia-Garcia RM, **Arias-Alvarez M**, Rebollar PG, Revuelta L, Lorenzo PL. Influence of different reproductive rhythms on serum estradiol and testosterone levels, features of follicular population and atresia rate, and oocyte maturation in controlled suckling rabbits.
Animal Reproduction Science, en prensa. Doi:10.1016/j.anireprosci.2008.10.007.

Arias-Alvarez M, Garcia-Garcia RM, Rebollar PG, Revuelta L, Millán P, Lorenzo PL. Influence of endocrine and metabolic status on oocyte quality and follicular characteristics at different postpartum periods in primiparous rabbit does.
Theriogenology, en prensa. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.04.017.

Arias-Alvarez M, Garcia-Garcia RM, Rebollar PG, Nicodemus N, Millán P, Revuelta L, Lorenzo PL. *Follicular, oocyte and embryo features related to metabolic status in primiparous lactating does fed with high- fibre rearing diets.*
Reproduction in Domestic Animals, en revisión

Arias-Alvarez M, Garcia-Garcia RM, Torres-Rovira L, González-Bulnes A, Rebollar PG, Lorenzo PL. Influence of hormonal and non-hormonal estrus synchronization methods on follicular and oocyte quality in primiparous lactating does at early *postpartum* period
Enviado

Arias-Alvarez M, Garcia-Garcia RM, Torres-Rovira L, González-Bulnes A, Rebollar PG, Lorenzo PL. Influence of leptin on nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation through MAPK and STAT pathways and on steroidogenic secretion of cumulus-oocyte complexes in rabbit oocyte model
Enviado.

Comunicaciones a congresos

Rebollar PG, Milanés A, Esquifino AI, Silván G, **Arias M**, Lorenzo PL.

Endocrine parameters in lactating rabbit does synchronized to stimulate ovarian activity at early post- partum.

XXXIII Congress of the Spanish Society of Physiological Sciences.

Journal of Physiology and Biochemistry, 61(1): pp 178

Sevilla (España), 10- 13 Febrero 2005

Arias-Álvarez M, López-Béjar M, Rebollar P.G, García-García R.M, Lorenzo P.L.

Nuclear and cytoplasmic patterns during in vitro maturation of rabbit oocytes

XII Meeting of Animal Production. Agriculture developmental association (AIDA)

ITEA Suppl, 28 (I): pp 42-44.

Zaragoza (España), 16-17 Mayo 2007.

Arias-Álvarez M., López-Béjar M., Rebollar P.G., García-García R.M., Lorenzo P.L.

Patrones nucleares y citoplasmáticos durante la maduración in vitro de oocitos de coneja.

Comunicación oral

XII Jornadas sobre Producción Animal. Asociación interprofesional para el desarrollo Agrario

ITEA 2007, Extra N° 28 (I):42-44.

Zaragoza (España), 16-17 de Mayo 2007.

García-García RM, **Arias-Álvarez M**, Revuelta L, Rebollar PG, Lorenzo PL.

Features of ovarian follicular population of nursing rabbits under different reproductive rhythms.

23rd Annual Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE).

Proceedings AETE 23rd Scientific Meeting: pp 166.

Alghero (España), 7- 8 Septiembre 2007.

Arias-Álvarez M, García-García RM, Revuelta L, Rebollar PG, Lorenzo PL.

Effects of leptin supplementation on nuclear and cytoplasmic in vitro maturation of rabbit oocytes.

34th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS)

Reproduction Fertility and Development, 20, (1): pp 198.

Denver (Colorado, EEUU), 5- 9 Enero 2008.

Arias-Álvarez M, García-García RM, Revuelta L, Cuadrado M, Millán P, Rebollar PG, Lorenzo PL.

Short term effects of different diets on ovarian function and oocyte maturation of rabbit nulliparous does.

9th World Rabbit Congress (WRSA).

Congress proceeding book and CD-ROM of 9th World Rabbit Congress (WRSA).

Verona (Italia), 10- 13 Junio 2008.

Arias-Álvarez M, García-García RM, Revuelta L, Rebollar PG, Lorenzo PL.

Effect of reproductive rhythm on the oocyte quality and fertility rate in primiparous does

16th International Congress on Animal Reproduction (ICAR).

Reproduction in Domestic Animals, Suppl 3, 43: pp 135.

Budapest (Hungria), 13- 17 Julio 2008.

Arias-Álvarez M, Bermejo-Álvarez P, Rizos D, Lorenzo PL, Gutierrez-Adan G, Lonergan P.

Effect of exogenous leptin on in vitro development of bovine embryos.

24th Annual Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE).

Proceedings AETE 24th Scientific Meeting: pp 126.

Pau (Francia), 12-13 Septiembre 2008.

Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Revuelta L, Lorenzo PL.

Follicular population characteristics of primiparous rabbit does under different reproductive rhythms.

9th Congress of the Spanish Association for Animal Reproduction (AERA) - 30th

Congress of the British Andrology Society (BAR).

Reproduction in Domestic Animals, Suppl 4, 43: pp 59.

Gijón (España), 22- 25 Octubre 2008.

Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Revuelta L, Lorenzo PL.

Detection of leptin receptor in rabbit ovary and effect of leptin on oocyte in vitro maturation.

XIII Meeting of Animal Production. Agriculture developmental association (AIDA).

ITEA Suppl: pp 697- 698.

Zaragoza (España), 21- 22 Mayo 2009.

Arias-Álvarez M, García-García RM, Torres-Rovira L, Rebollar PG, González-Bulnes A, Lorenzo PL.

Influence of leptin on steroidogenic secretion and nuclear in vitro maturation via MAPK pathway in the rabbit oocyte model.

Congress of the Society for reproduction and fertility (SRF).

Reproduction Suppl.

Oxford (Reino Unido), 12-14 Julio 2009.

Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Lorenzo PL.

Effect of a high- lignin rearing diet on follicular apoptosis and oocyte competence of primiparous lactating rabbits.

13th Congress of the European Society of Animal Reproduction (ESDAR) and Annual Meeting of EU-AI-vets.

Reproduction in Domestic Animals, Suppl.

Gante (Bélgica), 9-12 Septiembre 2009.

García-García RM, **Arias-Álvarez M**, Rebollar PG, Lorenzo PL.

Influence of a lignified rearing diet on ovulation rate and embryo survival of primiparous rabbit does.

13th Congress of the European Society of Animal Reproduction (ESDAR) and Annual Meeting of EU-AI-vets.

Reproduction in Domestic Animals, Suppl.

Gante (Bélgica), 9-12 Septiembre 2009. Complutense Travel funding.

Arias-Álvarez M, García-García RM, Rebollar PG, Lorenzo PL.

Influence of ecg vs. transient weaning methods on ovarian follicular atresia and oocyte maturation in primiparous lactating does at early postpartum period.

25th Annual Meeting of the European Embryo Transfer Association (AETE).

Proceedings AETE 25th Scientific Meeting.

Poznan (Polonia), 11- 12 Septiembre 2009.

